

50376
1999
243

Université des Sciences et Technologies de Lille I

THESE

**présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université en Sciences de la Vie et la Santé**

par

David Tulasne

**Voies de signalisation induites par l'HGF/SF
et son récepteur tyrosine kinase MET
dans les cellules épithéliales MDCK**



Présentée le 2 juillet 1999 devant la Commission d'Examen :

Président : Pr Xavier Desbiens
Rapporteurs : Dr Sandra Pellegrini
Dr Daniel Birnbaum
Examineurs : Dr Emmanuel Van Obberghen
Dr Bernard Vandebunder
Directeur de thèse : Dr Véronique Fafeur

SCD LILLE 1



D 030 293316 0

Je remercie

tout particulièrement, les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail.

Véronique Fafeur, qui m'a fait découvrir les mystères de la cellule et qui a eu la patience de me suivre pendant toute ma thèse.

Bernard Vandebunder, qui m'a accueilli dans son groupe et qui a toujours été disponible pour s'intéresser à mon travail.

Dominique Stehelin de m'avoir accepté dans son laboratoire où j'ai fait mes premiers pas en biologie.

Réjane Paumelle, qui a toujours écouté avec bienveillance mes raisonnements et mes idées de manips, même les plus farfelus.

Chantal Vercamer, Thierry Calmels, Fabrice Soncin et Agnès Bègue qui ont tous contribué à mon apprentissage de la biologie moléculaire.

très sincèrement, tous les membres de l'EP560. Ce serait trop long de tous les citer mais je n'oublie personne. Le travail que nous avons fait ensemble, mais aussi la disponibilité et la bonne humeur de tous, ont fait de ces années de thèse des moments très agréables.

Je n'oublie pas Dorothée dont le soutien m'est indispensable, ni Robin et Constant qui ont tout compris de la culture cellulaire. Je cite : « Prends des chips pour le travail, tu donneras à manger aux cellules »

Publications :

- 97 : FAFEUR, V., TULASNE, D., QUEVA, C., VERCAMER, C., DIMSTER, V., MATTOT, V., STEHELIN, D., DESBIENS, X. and B. VANDENBUNDER

The Ets1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter factor-stimulated MDCK epithelial cells.

Cell Growth and Diff. (1997) 8 : 655-665. *

- 99 : TULASNE, D., PAUMELLE, R., WEIDNER, K.M., VANDENBUNDER, B. and FAFEUR, V.

The multisubstrate docking site of the MET receptor is dispensable for MET-mediated RAS signaling cell scattering.

Mol Biol cell (1999) 10 : 551-565. *

- 99 : PAUMELLE, R., TULASNE, D., KHERROUCHE, Z., PLAZA, S., VANDENBUNDER, B. and FAFEUR, V.

Common activation of the ERK and JNK kinases by SF/HGF can lead to opposite effects on a RAS-dependent transcriptional response in MDCK epithelial cells.

(Manuscript en preparation)

* Publications présentées dans le mémoire

Abréviations

AP1	« activator protein 1 »
CREB	protéine liant l'élément CRE (« cAMP responsive element »)
EBS	« ETS binding site »
EGF	« epidermal growth factor », facteur de croissance de l'épiderme
ETS	« erythroid twenty six »
FAK	« focal adhesion kinase »
FGF	« fibroblast growth factor », facteur de croissance des fibroblastes
FRS2	« FGF receptor substrat 1 »
GAB1	« GRB2-associated binder-1 »
GAP	« GTPase-activating protein »
GRB2	« growth factor receptor-bound protein 2 »
HGF/SF	« hepatocyte growth factor/ scatter factor », facteur de croissance des hépatocytes/ facteur de dispersion
IRS1	« insulin-receptor substrat1 »
JAK	« janus kinase » ou « just another kinase »
JNK	« JUN N-terminal kinase »
MAPK	« mitogen-activated protein kinase »
MDCK	« Madin Darby Canine Kidney »
MMP	métalloprotéase de la matrice
PEA3	élément activateur A3 du virus du polyome
PI3K	« phosphatidylinositol 3-kinase »
PDGF	« platelet-derived growth factor », facteur de croissance dérivé des plaquettes
PLC γ	phospholipase C gamma
PTB	« phosphotyrosine binding domain »
RSK	kinase ribosomale S6
STAT	« signal transducer and activator of transcription »
SH	« SRC homology », domaine d'homologie à SRC
SHC	« SH2-containing sequence »
TIMP	« tissue inhibitor of metalloprotease »
TPR	« translocated promoter region »
uPA	« urokinase plasminogen activator »
VEGF	« vascular endothelial growth factor », facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires
ZO 1	Zonula occludens 1

Résumé

L'HGF/SF est un facteur de croissance mésenchymateux, dont le récepteur tyrosine kinase MET est présent majoritairement sur les cellules d'origine épithéliale. Sur les cellules en culture, HGF/SF est capable d'induire des réponses variées comme la prolifération, la dispersion et la morphogenèse de branchement. De manière intéressante, ces effets semblent correspondre aux capacités des cellules épithéliales à s'organiser en structures complexes *in vivo*, à la fois dans les conditions physiologiques normales et pathologiques. Cependant, les mécanismes intracellulaires mis en jeu par le couple HGF/SF-MET sont encore mal connus.

Dans un premier temps, nous avons établi un modèle de signalisation de l'HGF/SF dans les cellules épithéliales MDCK. L'HGF/SF est capable d'induire une réponse transcriptionnelle via RAS et le facteur de transcription ETS1, permettant l'activation de promoteurs contenant des sites composites EBS/AP1. Cette mise en jeu fonctionnelle de ETS1 par l'HGF/SF a été associée à des résultats décrivant l'augmentation de l'expression de ETS1, lors de la dispersion des cellules épithéliales MDCK induite par l'HGF/SF, et lors de processus de transition épithélium /mésenchyme durant l'embryogenèse du poulet (Fafeur et al., 1997).

Dans un deuxième temps, nous avons tiré parti de ce modèle pour évaluer l'implication des résidus tyrosines autophosphorylés de MET, lors de cette réponse transcriptionnelle RAS-dépendante. Nos résultats montrent que des récepteurs chimères TRK-MET, mutés sur les quatre résidus tyrosines de la partie C-terminale, induisent efficacement l'activation de la voie RAS-ERK et la dispersion, alors que deux de ces résidus sont indispensables pour le recrutement de nombreuses protéines de signalisation (Tulasne et al., 1999). De façon similaire, dans les fibroblastes, l'étude de formes constitutivement activées de MET, nous a permis de montrer que les tyrosines de l'extrémité C-terminale ne sont pas requises pour la réponse transcriptionnelle RAS-dépendante, alors qu'elles le sont pour la transformation.

Nos résultats remettent en question les mécanismes de signalisation initiés par MET, de même que leur implication dans les réponses biologiques et permettent d'envisager la caractérisation de mécanismes de signalisation originaux et l'identification de nouveaux partenaires pour le récepteur MET.

Table des matières

INTRODUCTION	7
Première partie : Le facteur de transcription ETS1	7
I. ETS1, membre fondateur de la famille ETS	7
II. Les domaines fonctionnels de ETS1	7
1) Domaine de liaison à l'ADN	7
2) Régulation de la liaison à l'ADN	8
3) Domaine de transactivation	8
4) Régulation de la transactivation	9
5) Domaine POINTED	9
III. Les cibles transcriptionnelles de ETS1	10
IV. Implication de ETS1 dans les processus physiologiques	11
A. ETS1 et l'hématopoïèse	11
B. ETS1 et la vascularisation	11
C. ETS1 et les interactions épithélium/mésenchyme	13
1) ETS1 et le développement de la glande mammaire	13
2) ETS1 et les processus invasifs	14
V. Conclusion	14
Deuxième partie : Le facteur de croissance HGF/SF et le récepteur MET	15
I. Structures et fonctions de MET et de l'HGF/SF	15
A. Les découvertes princeps	15
1) De l'oncogène TPR-MET au récepteur MET	15
(a) Découverte de TPR-MET	15
(b) Caractérisation du récepteur MET	15
(c) MET, RON et SEA trois récepteurs tyrosines kinases de la même famille	16
2) L'HGF et le SF	16
3) Le couple HGF/SF-MET	17

B. Les multiples fonctions du couple HGF/SF-MET, des cellules en culture à la souris

	17
1) Analyse des patrons d'expression; vers un dialogue épithélium /mésenchyme	17
2) Réponses induites par l'HGF/SF sur les cellules en culture	18
(a) HGF/SF est un facteur multifonctionnel	18
(b) Dispersion des cellules épithéliales	19
(c) Morphogenèse des cellules épithéliales	20
3) Régulation transcriptionnelle induite par l'HGF/SF	20
4) Implication du couple HGF/SF-MET durant le développement	22
(a) Extinction des gènes de l'HGF/SF et de MET ; transformation <i>in vivo</i> des essais obtenus <i>in vitro</i>	22
(b) Remplacement chez la souris du gène codant MET par une version mutée MET GRB2 ⁽⁻⁾	23
(c) L'épineux problème de la mise en place d'organes à structure épithéliale	24
5) Implication du couple HGF/SF-MET dans la tumorigenèse	24

II. Signalisation induite par le récepteur MET

A. Initiation de voies de signalisation par MET	25
1) Structure et activation des récepteurs tyrosines kinases	26
2) Activation du potentiel tyrosine kinase de MET	27
(a) La liaison de l'HGF/SF à MET	27
(b) Autophosphorylation de MET ; implication des tyrosines 8 et 9 dans l'activité catalytique	27
3) Site de liaison multisubstrat impliquant les tyrosines phosphorylées 14 et 15	28
(a) Recrutement de protéines cytoplasmiques	28
(b) Originalité du site d'ancrage multisubstrat de MET	29
4) Le site de liaison multisubstrat joue un rôle crucial dans les réponses biologiques induites par MET	29
(a) La danse des récepteurs chimères MET	29
(b) Les exemples du récepteur PDGFβR et du récepteur FGFR1	31
5) Le site de liaison multisubstrat est nécessaire pour la transformation	32

B. Implication des voies de signalisation dans la dispersion et la morphogenèse induites par l'HGF/SF

1) GRB2	33
(a) Recrutement de GRB2 par le résidu tyrosine 15	33
(b) Implication de GRB2 dans les réponses biologiques	33
(c) Le complexe GRB2-SOS ; facteur d'échange de RAS	35
(d) Implication de RAS dans les réponses biologiques	35
(e) RAS est à la base d'une cascade de kinase	36
(f) Les multiples casquettes de RAS	38

(g) RAS est-il suffisant pour induire la dispersion ou la morphogénèse ? _____	40
2) SHC _____	41
(a) SHC est une protéine adaptatrice capable de recruter GRB2 _____	41
(b) Implication de SHC dans les réponses biologiques _____	42
3) PI3K _____	42
(a) Recrutement de la PI3K par le site multisubstrat _____	42
(b) Implication de la PI3K dans la dispersion et la morphogénèse; Dialogue PI3K/RAS _____	43
(c) Les cibles de la PI3K _____	43
(d) RAS, PI3K et morphogénèse _____	44
4) SRC _____	44
(a) SRC est recrutée par le site multisubstrat _____	44
(b) SRC et l'HGF/SF dispersent les cellules MDCK par des mécanismes différents _____	45
5) STAT3 _____	45
(a) Protéine de signalisation et facteur de transcription _____	45
(b) STAT3 semble être recrutée par le site multisubstrat _____	46
(c) Spécificité d'action sur la morphogénèse de branchement _____	47
6) GAB1 _____	47
(a) Premier effecteur de MET découvert par la technique de double hybride _____	47
(b) Implication spécifique de GAB1 dans la morphogénèse ? _____	49
7) Les autres partenaires de MET _____	50
(a) L'implication de la PLC γ , de SHP-2, ou de NCK n'est pas élucidée _____	50
(b) BAG1 et PTP-S ne sont pas recrutés par le site multisubstrat _____	51
Conclusion _____	52
RESULTATS _____	54
Première partie : Mise en place d'un modèle de signalisation pour l'activation transcriptionnelle d'éléments de réponse à RAS, par l'HGF/SF _____	54
I. Introduction _____	54
II. Publication 1 _____	56
III. Résultats complémentaires : L'HGF/SF et RAS activent le potentiel transactivateur de ETS1 via le résidu thréonine 38 _____	57
IV. Discussion _____	58

A. ETS1, en aval ou en amont de MET ?	58
B. Les cascades ERK et JNK activées par MET régulent différemment les éléments EBS/AP1	59

Deuxième partie : Le site multisubstrat de MET n'est pas requis pour l'activation de la cascade RAS et de la dispersion _____ 60

I. Introduction	60
II. Publication 2	61
III. Résultats complémentaires : La mutation de l'ensemble des résidus tyrosines, situés en dehors du domaine kinase, ne semble pas affecter la transactivation	62
IV. Discussion et Perspectives	63
A. Vers une recherche de nouveaux partenaires de MET	63
1) Sur la piste de bons candidats	63
2) Stratégie biochimique	64
(a) Les exemples de FRS2 et de PTP-S	64
(b) Le tir à l'arbalète	65
3) Stratégie de biologie moléculaire	66
(a) Les exemples de BAG et GAB	66
(b) Le tir à l'arquebuse	66
B. Implication des résidus tyrosines pour l'activation de la voie RAS-ERK : les exemples d'autres récepteurs tyrosines kinases	67

Troisième partie : Cartographie fonctionnelle du récepteur MET _____ 69

I. Introduction	69
II. Résultats	70
A. Implication de la partie juxtamembranaire dans l'activation du récepteur MET	70
1) Délétion de la région juxtamembranaire	70
2) TRK-MET ^{Δ1} induit la transactivation du gène indicateur EBS/AP1-Luc	70
3) Intérêt de la poursuite du travail	71
B. Stratégie LEX-MET	72
1) Mise en place de la stratégie	72
2) Trois constructions pour une première approche	72

(a) Le cahier des charges est respecté	72
(b) Le domaine juxtamembranaire n'est pas impliqué dans la transactivation	73
3) Perspectives	74
(a) Implication de la voie RAS-ERK dans la transformation	74
(b) Poursuite de la cartographie du récepteur MET	75
4) Matériels et méthodes	76
<i>DISCUSSION GENERALE</i>	77
1) Notion de réseau de signalisation	77
2) Les nœuds nécessaires à la transduction du signal	77
3) Les différents niveaux de complexité	78
4) Intégration du signal	79
<i>Références bibliographiques</i>	81

Introduction

Préambule

Les cellules épithéliales s'organisent en structures cohésives et polarisées. De manière intéressante, cette organisation n'est pas figée. Ainsi, durant le développement, les cellules épithéliales peuvent migrer vers d'autres tissus, ou élaborer des structures complexes, comme lors de la formation du poumon. La mise en place et la réorganisation de ces structures sont donc nécessaires à la formation correcte des organes et tissus.

Ces processus impliquent de profonds bouleversements pour l'organisation des cellules épithéliales entre elles, pouvant entraîner de manière transitoire la perte des jonctions intercellulaires ou leur indépendance par rapport à la matrice extracellulaire. Ces processus sont également régulés par des facteurs de croissance qui assurent notamment un dialogue entre les structures épithéliales et les tissus adjacents. Chez l'adulte, la dérégulation de l'homéostasie des tissus épithéliaux est à l'origine de nombreux processus de tumorigenèse.

Nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires et cellulaires mettant en jeu cette plasticité des cellules épithéliales. Dans l'introduction, nous nous pencherons notamment sur le facteur de transcription ETS1 dont l'expression peut être associée en particulier à des processus de transition épithélium/mésenchyme. Nous nous intéresserons également au facteur de croissance HGF/SF et à son récepteur spécifique MET qui jouent un rôle essentiel dans la régulation des interactions épithélium/mésenchyme. Enfin, nous aborderons plus spécifiquement la signalisation intracellulaire du système HGF/SF-MET, qui permet d'aborder de manière plus générale le problème de l'intégration des voies de signalisation par un facteur multifonctionnel.

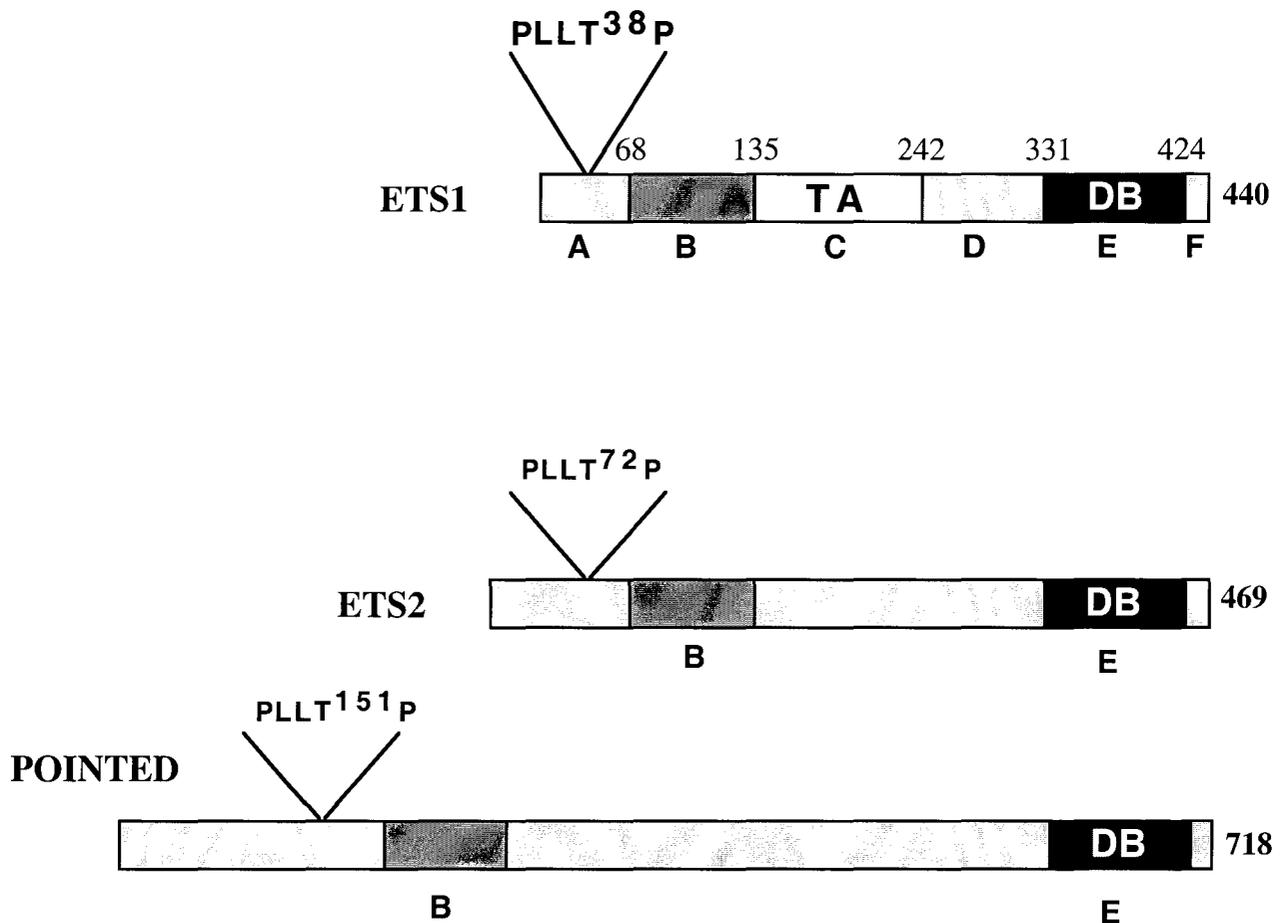


Figure 1: Représentation schématique de la protéine ETS1 de souris, ETS2 Humaine et POINTED P2 de Drosophile

-A: Ce domaine contient un site putatif de phosphorylation par les MAPK (PLLTP), retrouvé dans ETS1, ETS2, et POINTED P2

-B: Domaine qui présente des identités de séquence entre 9 membres de la famille ETS, dont ETS1, ETS2, POINTED P2, ou TEL. Cette région, baptisée domaine Pointed, pourrait intervenir dans les interactions avec d'autres protéines.

-C: Domaine transactivateur (TA)

-D: Ce domaine est le cible de phosphorylation calcium-dépendante sur des résidus sérines. Il régule négativement la liaison de ETS1 à l'ADN.

-E: Domaine de liaison à l'ADN (DB). C'est la partie la plus conservée au sein de la famille ETS.

-F: Ce domaine contribue également à la régulation de la liaison à l'ADN.

INTRODUCTION

Première partie : Le facteur de transcription ETS1

I. ETS1, membre fondateur de la famille ETS

Le proto-oncogène ETS1 est l'homologue cellulaire de l'oncogène v-ETS du virus de l'érythroblastose aviaire E26 (Leprince et al., 1983; Nunn et al., 1983). Le retrovirus contient également l'oncogène v-myb (myeloblastosis). La production d'une protéine de fusion GAG-MYB-ETS dans les cellules infectées est responsable des propriétés transformantes du virus E26 (Metz and Graf, 1991), qui provoque des leucémies mixtes myéloïdes et érythroïdes chez le poulet (Graf et al., 1979).

ETS1 est le membre fondateur d'une grande famille de facteur de transcription qui ont en commun une séquence protéique assez homologue de 85 acides aminés. Cette séquence correspond à leur domaine de fixation à l'ADN (domaine DB pour « DNA binding »). Les membres de la famille ont été identifiés dans diverses espèces, allant de la Drosophile à l'Homme. La comparaison des séquences entre le domaine DB des différentes protéines ETS a permis de classer les protéines en sous familles et groupes. ETS1 fait partie du groupe ETS, constitué également de ETS2 et de la protéine de drosophile POINTED P2 (Laudet et al., 1999).

II. Les domaines fonctionnels de ETS1

Sur la base de données fonctionnelles, mais également grâce à des homologies de séquences avec d'autres membres, la protéine ETS1 peut être découpée en domaines, représentés schématiquement sur la Figure 1.

1) Domaine de liaison à l'ADN

Le fragment de 85 acides aminés, conservé chez les membres de la famille ETS, est nécessaire et suffisant pour la liaison à l'ADN. Pour ETS1, ce domaine est situé dans la partie C-terminale de la protéine, ce qui n'est pas le cas pour tous les membres de la famille. La recherche d'oligonucléotides aléatoires capables de lier ETS1 a permis d'identifier une séquence préférentiellement reconnue, permettant la liaison de ETS1 sur l'ADN. Les résultats montrent que

la protéine ETS1 lie l'ADN sur des séquences EBS (pour « ETS binding site ») d'une quinzaine de bases, centrées autour d'un cœur GGA(A/T). Des expériences de retard sur gel ont montré que ETS1 lie le site EBS en monomère (Nye et al., 1992).

L'analyse cristallographique du domaine DB de PU-1 et l'analyse par résonance magnétique nucléaire du domaine DB de ETS1 révèlent une organisation du domaine en trois hélices α (H1, H2, H3) et 4 feuillets β . Ce sont les hélices H2 et H3 qui sont responsables des interactions entre le facteur de transcription et l'ADN (Kodandapani et al., 1996; Werner et al., 1995).

2) Régulation de la liaison à l'ADN

De part et d'autre du domaine DB se trouvent deux régions capables d'inhiber la fixation à l'ADN. Le premier domaine est situé en N-terminal du domaine de liaison à l'ADN (Wasylyk et al., 1992), le second est situé à l'extrémité C-terminale de la protéine et est constitué de 16 acides aminés (Hagman and Grosschedl, 1992; Lim et al., 1992). Une interaction intra-moléculaire entre les deux domaines masquerait le domaine DB et inhiberait la fixation de la protéine à l'ADN. L'interaction de ETS1 avec l'ADN provoquerait des modifications conformationnelles qui permettraient de lever l'inhibition (Donaldson et al., 1996; Jonsen et al., 1996; Petersen et al., 1995).

D'autre part, des résidus sérines, situés dans le domaine en N-terminal, peuvent être phosphorylés de manière calcium-dépendante (Koizumi et al., 1990; Pognonec et al., 1988). Ces phosphorylations inhibent la fixation de ETS1 sur l'ADN, sans affecter sa localisation nucléaire (Rabault and Ghysdael, 1994). Il est intéressant de noter que cette région régulatrice se trouve sur un exon qui peut subir un épissage alternatif. Ainsi, la protéine ETS1 dépourvue de cet exon ne subirait pas les régulations négatives calcium-dépendante (Fisher et al., 1994).

3) Domaine de transactivation

Contrairement au domaine de fixation à l'ADN, le ou les domaines transactivateurs ne sont pas conservés entre les membres de la famille ETS. Ce domaine peut être de type acide (ELF1, ETS2), riche en glutamine (PU1) ou riche en proline (ERG, FLI). Pour ETS1, des délétions ont permis de cartographier approximativement le domaine transactivateur. Il se situe dans la partie

centrale de la protéine (Albagli et al., 1994; Schneikert et al., 1992), et présente de nombreux résidus hydrophobes (pour revue voir (Crepieux et al., 1995). La grande diversité dans la structure des domaines transactivateurs reflète sans doute une grande diversité d'interaction avec la machinerie transcriptionnelle. Bien que les interactions entre ETS1 et la machinerie transcriptionnelle ne soient pas identifiées, les mécanismes nécessaires à l'activation de ETS1, notamment par phosphorylation et par l'interaction avec d'autres facteurs de transcriptions sont de plus en plus clairs.

4) Régulation de la transactivation

Les protéines ETS1, ETS2 et POINTED P2 présentent dans leur région N-terminale une séquence conservée (PLLTP) correspondant à un site putatif de phosphorylation par les MAPK (pour « mitogen activated protein kinase »). Des analyses génétiques chez la drosophile ont montré que le facteur de transcription POINTED P2 est un régulateur positif de la différenciation des photo-récepteurs ; son activité transcriptionnelle est stimulée par la voie RAS-ERK et le résidu thréonine du site putatif de phosphorylation est nécessaire pour ce contrôle (Brunner et al., 1994; O'Neill et al., 1994). De plus, POINTED P2 peut être phosphorylée *in vitro* sur ce résidu par les kinases ERK (Brunner et al., 1994). De même, il a été montré dans divers types cellulaires, que RAS et RAF sont capables d'activer le potentiel transactivateur de ETS2 via sa phosphorylation par les kinases ERK sur le résidu thréonine conservé (Fowles et al., 1998; McCarthy et al., 1997; Yang et al., 1996).

Sur ETS1, le résidu thréonine situé dans la séquence PLLT³⁸P est également nécessaire pour l'activation RAS-dépendante du potentiel transactivateur de ETS1 (Yang et al., 1996). De plus, le résidu thréonine 38 de ETS1 est phosphorylé dans les cellules COS, suite à la stimulation par le sérum (Rabault et al., 1996). Cependant, bien que ETS1 soit phosphorylée *in vitro* par ERK2 (Rabault et al., 1996), les kinases cellulaires capables de phosphoryler ETS1 ne seraient ni ERK1 ni ERK2 (Yang et al., 1996).

5) Domaine POINTED

Neuf membres de la famille ETS, dont POINTED P2, ETS1, ETS2, ERG ou TEL ont en commun un domaine conservé baptisé domaine PNT pour sa caractérisation initiale sur

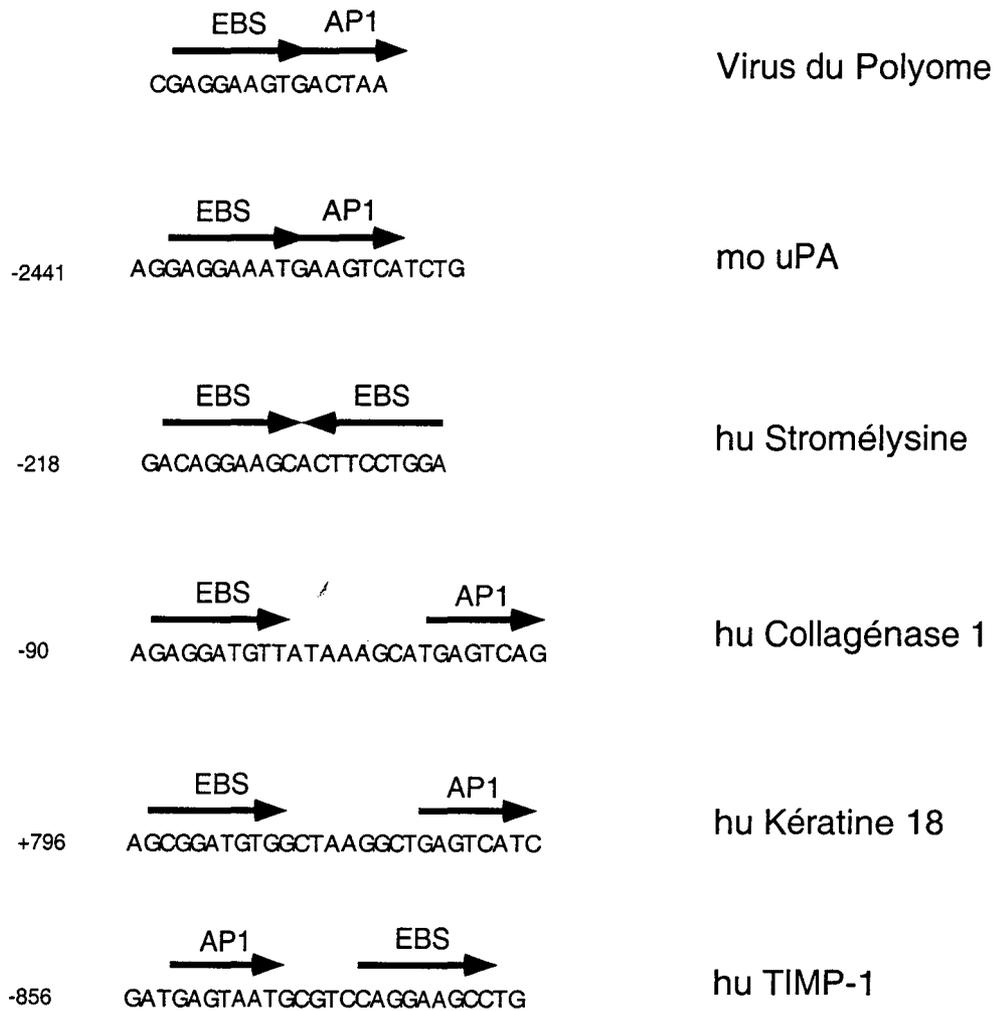


Figure 2: Séquence nucléotidique des sites de liaison EBS et AP1, identifiés de manière fonctionnelle dans l'élément activateur du virus du polyome et des promoteurs des gènes de l'uPA, la stromélysine, la collagénase 1, la kératine 18 ou le TIMP-1

POINTED P2. Dans le cas de TEL, le domaine PNT est responsable de l'activité oncogénique de protéines chimériques entre TEL et le récepteur PDGF β R (Golub et al., 1994). En fait, le domaine PNT de TEL est un domaine de dimérisation ; la fusion du domaine PNT au récepteur PDGF β R provoquerait l'activation constitutive du récepteur (Jousset et al., 1997). En revanche, les domaines PNT de ETS1 ou ERG sont incapables de se dimériser (Jousset et al., 1997). Cependant, l'analyse structurale du domaine PNT de ETS1 par RMN révèle une organisation du domaine en cinq hélices, responsables de la formation d'une structure globulaire de laquelle se détache l'extrémité N-terminale portant le site putatif de phosphorylation par les MAPK. Bien que la phosphorylation du domaine PNT sur la théonine 38 ne modifie pas la structure du domaine, les auteurs émettent l'hypothèse que la phosphorylation RAS-dépendante puisse, via des modifications conformationnelles du domaine PNT, activer le potentiel transactivateur de ETS1 (Slupsky et al., 1998).

III. Les cibles transcriptionnelles de ETS1

De manière générale, il semble que l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription de la famille ETS soit plus importante quand ceux ci coopèrent avec d'autres facteurs de transcription. La coopération entre ETS1 et un autre facteur de transcription a été mise en évidence pour la première fois sur l'élément activateur du virus du polyome. Cet élément contient un site EBS suivi d'un site AP1 (site de fixation pour les protéines de la famille des facteurs de transcription FOS et JUN) (Figure 2). Les sites EBS et AP1 sont tous deux nécessaires pour l'activation de cet élément de réponse. De plus, les facteurs de transcription ETS1 et FOS/JUN coopèrent pour induire la transactivation (Wasylyk et al., 1990). Depuis, d'autres sites combinés fonctionnels, de type EBS/AP1, ont été découverts dans de nombreux promoteurs cellulaires. Il s'agit notamment des promoteurs de l'uPA, de la collagénase, de la kératine18 ou de TIMP-1 (Figure 2).

De façon intéressante, ces éléments de réponses confèrent aux promoteurs de la collagénase et de l'uPA leur inductibilité par une forme activée de RAS (Gutman and Wasylyk, 1990; Stacey et al., 1995). Ainsi, les éléments EBS/AP1 ont également été baptisés RRE pour « RAS responsive element ». La même propriété a été mise en évidence sur des éléments de réponse EBS en tandem inversé, présents par exemple sur le promoteur de la stromélysine 1 (Wasylyk et al., 1991) (Figure 2).

L'élément activateur du virus des lymphocytes T humains (HTLV1) présente un autre type d'élément bipartite. Cette fois, le site EBS est précédé par un site de fixation pour le facteur de transcription SP1. *In vitro*, les facteurs ETS1 et SP1 forment un complexe ternaire avec le site SP1-EBS. Dans ce cas aussi, les tests de transactivation révèlent que ETS1 et SP1 activent en synergie la transcription à partir de ce site (Gégonne et al., 1993).

IV. Implication de ETS1 dans les processus physiologiques

A. ETS1 et l'hématopoïèse

Initialement, les protéines ETS1 ont été détectées par immunoprécipitation dans des lysats cellulaires issus de thymus ou de la bourse de fabricius d'embryon de poulet (Ghysdael et al., 1986). Des analyses des populations cellulaires composant le thymus de souris ont révélé que l'expression de ETS1 correspondait à l'apparition des thymocytes de types CD4⁺/CD8⁻ (Bhat et al., 1989), suggérant une fonction du facteur de transcription dans la différenciation des cellules T et plus particulièrement des cellules auxiliaires dérivées des thymocytes CD4⁺/CD8⁻.

L'extinction, dans les cellules T, du gène codant ETS1 (Bories et al., 1995; Muthusamy et al., 1995), et plus tard son extinction dans toute la souris (Barton et al., 1998) a permis de préciser la fonction de ETS1 durant l'hématopoïèse. En fait, ETS1 n'est pas requis pour l'établissement de lymphocytes T, mais son absence réduit fortement leur survie (Bories et al., 1995; Muthusamy et al., 1995). En revanche, ETS1 est indispensable pour l'établissement de la lignée des NK (« natural killer ») (Barton et al., 1998).

La description de l'expression de ETS1 durant le développement, grâce à la technique d'hybridation *in situ*, a permis de confirmer l'expression de ETS1 pendant l'hématopoïèse. De plus, l'expression de ETS1 a pu être associée à de nombreux autres processus (Vandenbunder et al., 1994).

B. ETS1 et la vascularisation

Au cours de la vasculogénèse (création *de novo* de vaisseaux sanguins), les transcrits de ETS1 ont été détectés dans des îlots sanguins de la zone extra-embryonnaire. Lorsque les îlots deviennent matures, cette expression se restreint à leur périphérie, à l'endroit même où la différenciation des cellules endothéliales se poursuit. L'expression de ETS1 est également

détectée dans la paroi des vaisseaux sanguins au début de leur développement, notamment au niveau des cellules endothéliales de l'aorte, qui est le premier vaisseau à se former chez l'embryon. Dans certains organes, tels que le rein ou le cerveau, où la vascularisation se met en place par des processus d'angiogenèse (création de vaisseaux sanguins à partir du réseau préexistant), l'expression de ETS1 a également été observée (Vandenbunder et al., 1989). Cette corrélation, entre l'expression de ETS1 et le déroulement du processus angiogénique, a de nouveau été retrouvée dans des situations pathologiques comme l'angiogenèse tumorale (Bolon et al., 1995; Wernert et al., 1992). D'autre part, *in vitro*, l'expression de ETS1 semble induite dans des cellules endothéliales humaines par plusieurs facteurs de croissances FGF1 et 2, l'EGF, et le VEGF (Chen et al., 1997; Iwasaka et al., 1996).

Il faut noter que ETS1 n'est pas le seul membre de sa famille exprimé au cours du processus angiogénique. Les patrons d'expression de ERG (Dhordain et al., 1995) et de FLI se superposent à celui de ETS1, notamment dans les vaisseaux sanguins au début du développement embryonnaire. Ces deux facteurs de transcription sont donc des acteurs moléculaires putatifs de l'angiogenèse. De plus, la récente inactivation dans la souris de TEL, un autre membre de la famille ETS, met en évidence son implication au cours du processus angiogénique (Wang et al., 1997).

De façon à préciser l'implication de ETS1 durant la vasculogenèse ou l'angiogenèse, les auteurs ont utilisé différentes stratégies. Des oligonucléotides antisens, issus de la séquence de ETS1, ont été utilisés pour interférer avec son expression. Des cellules endothéliales humaines, traitées par ces oligonucléotides, migrent de façon moins importante suite à la stimulation par des facteurs angiogéniques (Chen et al., 1997; Iwasaka et al., 1996). De plus, le phénotype corrèle avec une diminution de l'expression de l'uPA et de la collagénase 1. Ces résultats suggèrent que ETS1 serait capable de réguler l'expression de ces protéases, qui possèdent des sites EBS fonctionnels dans leur promoteur. Néanmoins, au cours du développement embryonnaire le patron d'expression de ETS1, notamment durant les processus angiogéniques, ne sont absolument pas superposables à ceux de la collagénase 1 ou l'uPA, suggérant que durant le développement ces gènes ne sont pas les cibles de ETS1 (Mattot et al., 1995).

Une autre stratégie a pu être mise en place dans le laboratoire, inspirée des travaux de B. Wasylyk et ses collaborateurs, qui ont démontré qu'une forme tronquée de la protéine ETS1, constituée uniquement du domaine de liaison à l'ADN (ETS1-DB), est capable d'inhiber la

transactivation induite par RAS sur des sites EBS/AP1 (Wasylyk et al., 1994). En fait, la protéine ETS1-DB occupe les sites EBS et rend donc indisponible ces sites pour les facteurs de transcription capables de s'y lier : en l'occurrence les membres de la famille ETS. L'utilisation de vecteurs rétroviraux ont permis l'expression de ces mutants dominants négatifs dans des cellules endothéliales murines. Les résultats démontrent que la migration et la prolifération des cellules endothéliales exprimant la protéine ETS1-DB ne sont pas modifiées. En revanche, l'adhérence et l'organisation du cytosquelette de ces cellules, ainsi que leurs capacités de morphogenèse sont altérées (Mattot et al., Soumis). Ces résultats permettent d'envisager d'autres implications des facteurs de transcription ETS dans les cellules endothéliales, comme la régulation des mécanismes d'adhérence.

C. ETS1 et les interactions épithélium/mésenchyme

1) ETS1 et le développement de la glande mammaire

Les interactions entre les tissus épithéliaux et mésenchymateux sont importantes pour le développement de la glande mammaire. L'expression des transcrits de ETS1 a pu être associée à des processus mettant en jeu ce type d'interaction. La technique d'hybridation *in situ* a notamment permis de révéler l'expression des transcrits de ETS1 dans les mésenchymes à proximité des bourgeons de cellules épithéliales, au début de la formation de la glande mammaire. Plus tard, les transcrits sont détectés dans les cellules épithéliales situées à l'extrémité des tubules épithéliaux (Delannoy-Courdent et al., 1996). Trois autres membres de la famille ETS, appartenant à la sous famille PEA3, ont un patron d'expression similaire durant la formation des tubules (Chotteau-Lelievre et al., 1997).

Les vecteurs rétroviraux, exprimant le domaine de fixation à l'ADN de ETS1 (ETS1-DB), mis au point dans laboratoire, ont permis l'expression de ce mutant dominant négatif, dans des cellules épithéliales murines issues de la glande mammaire. En fait, ETS1-DB est capable d'inhiber la motilité et de perturber la formation de tubules en gel de collagène, induit par du milieu conditionné de fibroblastes NIH3T3. De plus, ces effets corrélerent avec une diminution de l'expression et de l'activité de l'uPA. Ainsi, il semble que les facteurs de transcription de la famille ETS soient impliqués dans la motilité et la tubulogenèse des cellules épithéliales

mammaires, via l'activation de gènes, comme l'uPA, dont l'activité contribue à la dégradation de matrice extracellulaire (Delannoy-Courdent et al., 1998).

2) ETS1 et les processus invasifs

Une corrélation, entre l'expression de ETS1 et la migration cellulaire, a été observée au cours de situations physiologiques normales ou pathologiques. Les transcrits de ETS1 ont été détectés durant les premiers jours de développement de l'embryon de poulet, au stade de la gastrulation dans les cellules mésodermiques en cours de migration (Quéva et al., 1993). Plus tard, l'expression de ETS1 a été détectée dans les cellules dermiques en migration qui se regroupent pour former les bourgeons des plumes (Desbiens et al., 1991; Quéva et al., 1993).

Les transcrits de ETS1 ont également été détectés dans des fibroblastes du stroma tumoral et plus particulièrement dans ceux situés à proximité des zones tumorales invasives (Wernert et al., 1994).

V. Conclusion

ETS1 est un facteur de transcription, dont le potentiel transactivateur est contrôlé par la coopération avec d'autres facteurs de transcription, et par des phosphorylations calcium et RAS dépendantes. Les profils d'expression de ETS1 dans les cellules et chez l'animal permettent de proposer que ETS1 est impliqué dans l'hématopoïèse, l'angiogenèse et durant des interactions épithélium/mésenchyme. Des données fonctionnelles semblent confirmer l'implication de ETS1 durant ces processus. Néanmoins, les gènes cibles, de même que les mécanismes moléculaires mis en place pour l'activation de ETS1 sont mal connus.

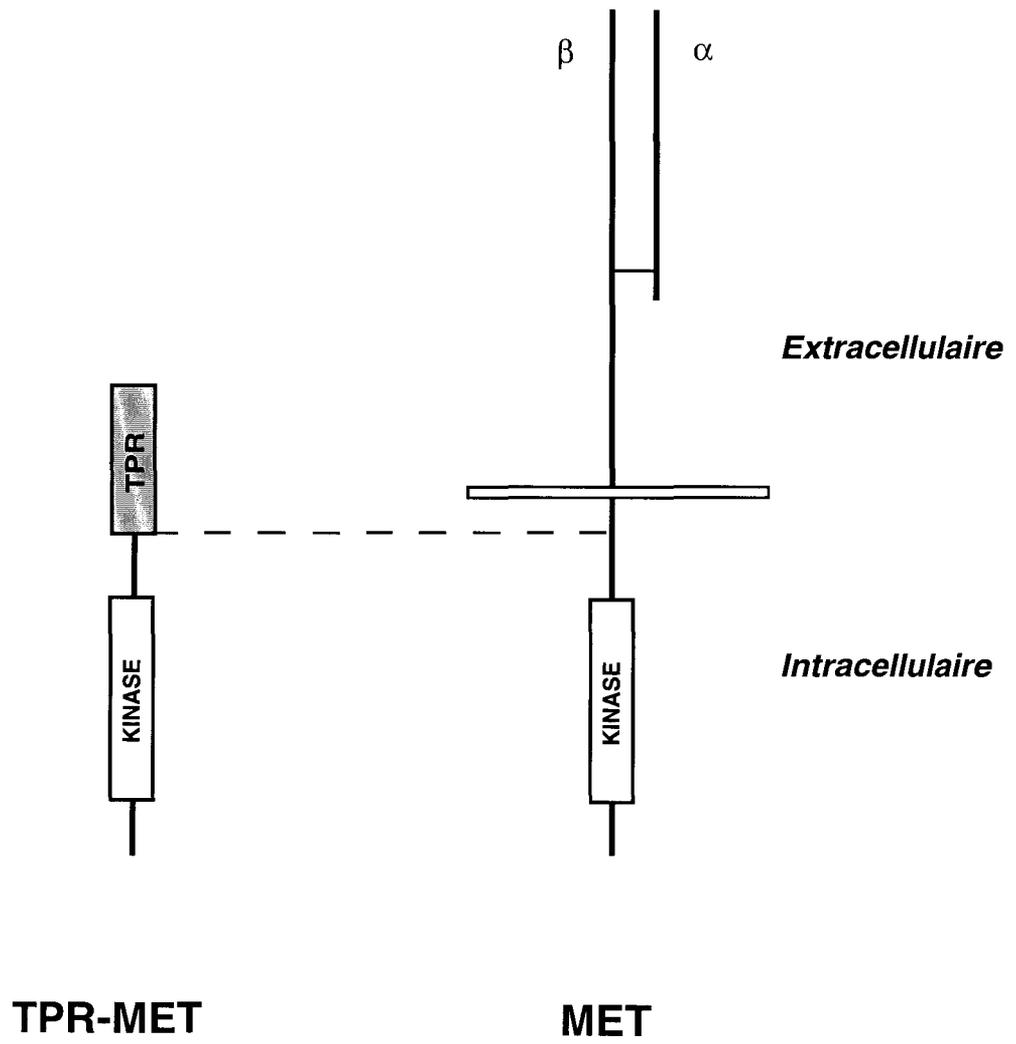


Figure 3: Représentation schématique de l'oncogène TPR-MET et du récepteur tyrosine kinase MET

Deuxième partie : Le facteur de croissance HGF/SF et le récepteur MET

I. Structures et fonctions de MET et de l'HGF/SF

A. Les découvertes princeps

1) De l'oncogène TPR-MET au récepteur MET

(a) Découverte de TPR-MET

L'histoire du récepteur MET débute en 1984, lorsque Cooper et ses collaborateurs isolent l'oncogène TPR-MET à partir d'une lignée HOS, dérivée d'un ostéosarcome humain et transformée par un carcinogène chimique (Cooper et al., 1984). La transfection, dans des cellules NIH3T3, des ADNc issues de cette lignée transformée, a permis d'isoler l'oncogène TPR-MET. La caractérisation de l'oncogène montre qu'il résulte d'un réarrangement entre le gène *tpr* (pour « translocated promoter region ») localisé sur le chromosome 1 et une forme tronquée du gène *c-met* localisé sur le chromosome 6 (translocation 7q21-31) (Figure 3).

Le gène *tpr* code une protéine dont la fonction est encore mal connue. La protéine TPR possède dans sa partie N-terminale un motif « leucine zipper » impliqué dans les dimérisations protéine/protéine. Le gène *c-met* code, quant à lui, une séquence très proche des récepteurs tyrosine kinase. La protéine TPR permet une dimérisation constitutive des protéines TPR-MET et stimule l'activité tyrosine kinase de MET (Rodrigues and Park, 1993) ; à la fois la dimérisation induite par TPR (Rodrigues and Park, 1993) et l'activité tyrosine kinase de MET (Rodrigues and Park, 1994) sont responsables du caractère oncogénique de TPR-MET.

(b) Caractérisation du récepteur MET

Après traduction, un précurseur de 170 kDa de la protéine MET subit une maturation au cours de laquelle le récepteur est glycosylé, puis clivé en une sous-unité α de 50 kDa et une sous-unité β de 145 kDa. Les deux sous-unités restent associées par des ponts disulfures, créant ainsi un dimère $\alpha\beta$ de 190 kDa. La sous-unité α est exclusivement extracellulaire. La sous-unité β possède trois domaines fonctionnels distincts; un domaine extracellulaire capable d'interagir avec

le ligand, un domaine transmembranaire permettant la localisation à la membrane plasmique, et un domaine intracellulaire portant l'activité catalytique tyrosine kinase (Figure 3). Le récepteur MET restera orphelin de son ligand jusqu'en 1991.

(c) MET, RON et SEA trois récepteurs tyrosines kinases de la même famille

Deux autres récepteurs tyrosines kinases présentent de fortes homologues avec MET. Il s'agit des récepteurs RON et SEA qui forment avec MET une sous famille parmi les récepteurs tyrosines kinases.

Le récepteur SEA présente 35 % d'identité de séquence en acide aminé avec MET (Huff et al., 1993). SEA a été découvert grâce à la présence, dans un rétrovirus oncogénique aviaire, d'une protéine de fusion entre une protéine d'enveloppe du virus et le domaine intracellulaire de SEA (Hayman et al., 1985). Le récepteur RON présente, quant à lui, 63 % d'identité de séquence en acide aminé avec MET (Ronsin et al., 1993). RON a été isolé à partir d'une banque d'ADNc, préparée à partir de tumeurs humaines, hybridées avec des oligonucléotides représentatifs de séquences codant des protéines à activité tyrosine kinase (Ronsin et al., 1993). Le ligand spécifique de RON est le « macrophage stimulating protein » (MSP) (Gaudino et al., 1994; Wang et al., 1994). En revanche, le ligand de SEA n'est à ce jour pas identifié.

Comme MET, RON et SEA sont constitués de deux chaînes α et β liées par des ponts disulfures. De plus, les résidus tyrosines phosphorylées suite à l'activation des trois récepteurs sont les mêmes. MET, RON et SEA ont également en commun certaines réponses biologiques. Néanmoins leurs patrons d'expression ne sont pas similaires, suggérant des implications dans des situations distinctes (pour revue voir (Comoglio and Boccaccio, 1996).

2) L'HGF et le SF

En 1984, Nakamura et ses collaborateurs isolent, à partir de plasma de rats partiellement hépatectomisés, un facteur capable d'induire la prolifération d'hépatocytes en culture (Nakamura et al., 1984). Par cette capacité, ce facteur est baptisé « hepatocyte growth factor » (HGF). Plus tard, le facteur est purifié et son gène est cloné. Il s'agit d'une protéine hétérodimérique de 82 kDa, composée d'une sous-unité α de 69 kDa et d'une sous-unité β de 34 kDa, reliées par des ponts disulfures. Les deux sous-unités dérivent d'un précurseur commun, qu'une protéase

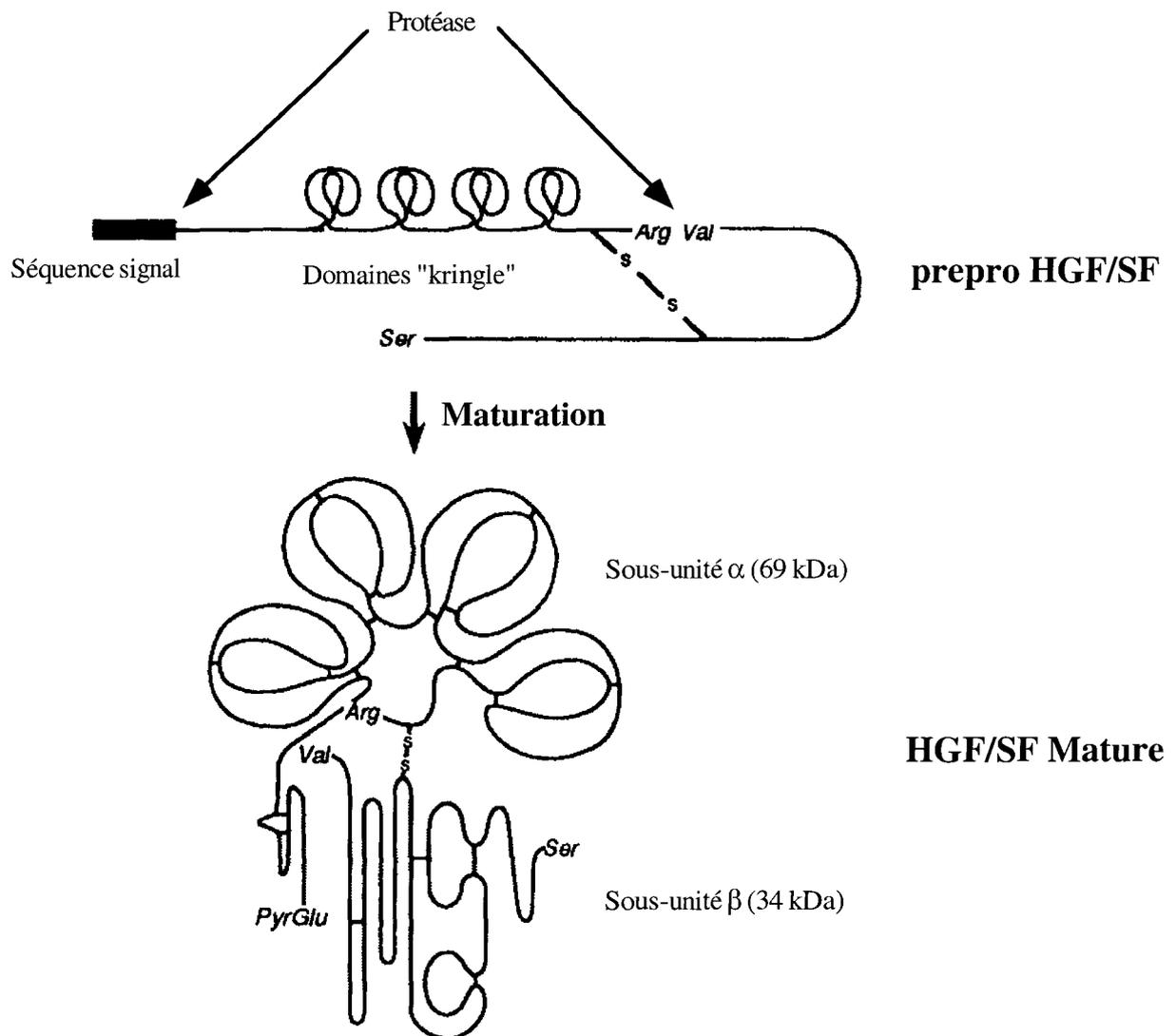


Figure 4: Maturation de l'HGF/SF et structure schématique de la forme mature (D'après Matsumoto and Nakamura, 1996)

transforme en protéine hétérodimérique fonctionnelle (Miyazawa et al., 1993; Mizuno et al., 1994). La sous-unité α de l'HGF possède quatre domaines en boucle, formés par trois liaisons disulfures intra-chaînes (domaine « kringle ») (Figure 4). Ces domaines sont retrouvés dans le plasminogène qui présente 38% d'homologie en acides aminés avec l'HGF. Mais l'HGF ne partage pas l'activité sérine protéase du plasminogène, et inversement, le plasminogène ne partage pas les activités biologiques de l'HGF.

Trois ans plus tard, dans un autre laboratoire, Stocker et ses collaborateurs identifient à partir d'un surnageant de culture de fibroblastes d'embryon humain, un nouveau facteur capable de disperser des îlots de cellules épithéliales en culture. Par cette capacité, ce facteur est baptisé "scatter factor" (SF) (Stoker et al., 1987).

3) Le couple HGF/SF-MET

En 1991, deux équipes distinctes montrent que l'HGF induit la phosphorylation de la sous-unité β du récepteur tyrosine kinase MET, suggérant que l'HGF est le ligand du récepteur MET (Bottaro et al., 1991; Naldini et al., 1991).

La même année, le clonage de l'ADNc du SF permet d'affirmer que les séquences du SF et de l'HGF sont parfaitement identiques. De plus, les réponses biologiques induites par chaque facteur sont interchangeables de l'un à l'autre et les deux facteurs se fixent avec la même affinité sur le récepteur MET (Naldini et al., 1991; Weidner et al., 1991). Dès lors, l'HGF et le SF ne font qu'un et ce facteur est rebaptisé HGF/SF. De plus, le récepteur MET n'est plus orphelin, l'HGF/SF est son ligand.

B. Les multiples fonctions du couple HGF/SF-MET, des cellules en culture à la souris

1) Analyse des patrons d'expression; vers un dialogue épithélium /mésenchyme

A partir de culture cellulaire, il a été montré que l'HGF/SF est exprimé par les cellules mésenchymateuses, alors que le récepteur MET est exprimé par les cellules d'origines épithéliales (Stoker et al., 1987).

La description précise de l'expression de l'HGF/SF et de son récepteur au niveau d'un organisme, notamment par la technique d'hybridation *in situ*, a confirmé les observations faites sur les cultures cellulaires. En effet, MET est principalement détectée dans les cellules épithéliales de nombreux organes en formation (foie, rein, poumon, glande mammaire, *etc*), alors que son ligand est détecté dans les cellules mésenchymateuses adjacentes (Sonnenberg et al., 1993).

Depuis longtemps, les embryologistes ont mis en évidence que les interactions épithélium/mésenchyme jouent un rôle crucial pour le développement correct des organes. Les tissus mésenchymateux seraient notamment responsables de la mise en place des organes à structures épithéliales tubulaires, comme les reins, les glandes mammaires, le pancréas, ou les poumons, ou dans la mise en place de structures épithéliales plus simples, comme l'intestin ou le placenta. La localisation complémentaire de l'HGF/SF et de MET associée à ses capacités motogène, morphogène et/ou mitogène font du couple un système exemplaire pour le contrôle des tissus épithéliaux par les tissus mésenchymateux adjacents.

L'expression de MET a également été détectée dans de nombreuses autres situations. On peut noter, par exemple, son expression lors de stades très précoces du développement (blastula), ou plus tard, dans des précurseurs de cellules musculaires au niveau du dermomyotome, ou dans des cellules de type neuronal (Sonnenberg et al., 1993).

2) Réponses induites par l'HGF/SF sur les cellules en culture

(a) HGF/SF est un facteur multifonctionnel

Dans les cellules exprimant MET, l'HGF/SF est capable d'induire de multiples réponses biologiques ; sur les hépatocytes, les mélanocytes et les cellules endothéliales, l'HGF/SF a une action mitogène (Bussolino et al., 1992; Matsumoto and Nakamura, 1996; Nakamura et al., 1984); dans des cellules neuronales, l'HGF/SF favorise la survie cellulaire (Matsumoto et al., 1995); sur des cultures organotypiques de follicules pileux, l'HGF/SF est même capable de stimuler la pousse des cheveux (Jindo et al., 1995).

Ainsi, selon le type de cellules étudiées, l'HGF/SF semble avoir de multiples fonctions. Pourtant, par rapport à d'autres facteurs de croissance, l'HGF/SF tire sa véritable originalité de sa capacité à remodeler des structures épithéliales. Comme la plupart des autres cellules, la

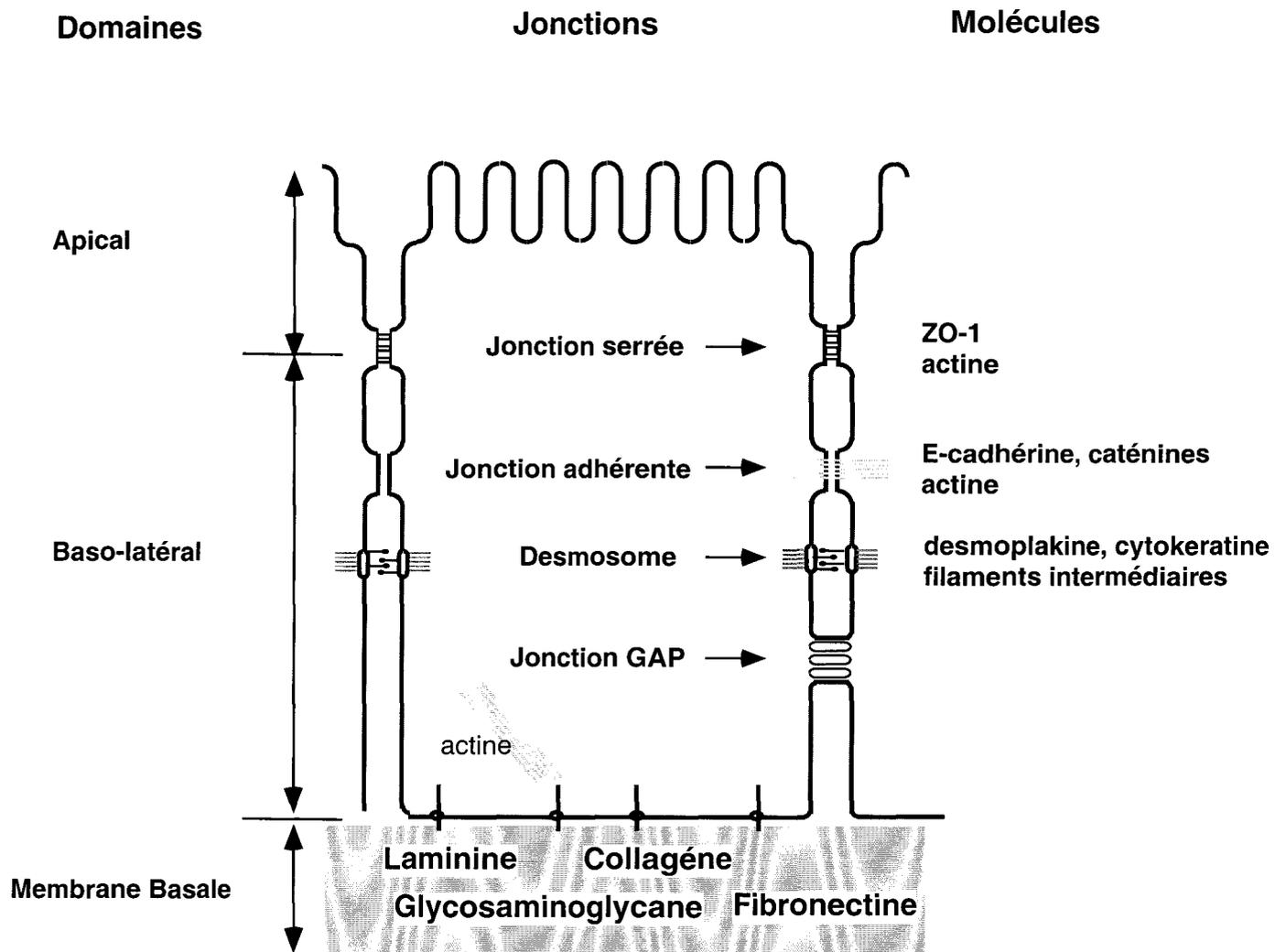


Figure 5: Représentation schématique d'une cellule épithéliale polarisée, avec ses différents domaines (gauche), ses différentes jonctions qui assurent les interactions cellule/cellule (milieu), et les molécules impliquées dans ces interactions (droite). (D'après Mareel et al., 1993)

physiologie des cellules épithéliales est régulée par des facteurs extracellulaires, et des interactions cellule/matrice extracellulaire et cellule/cellule. L'importance de ces interactions est particulièrement claire pour les cellules épithéliales, puisque l'interaction avec la matrice conditionne leur polarisation, et qu'une série de jonctions intercellulaires spécifiques leurs permettent de former des structures cohésives (Figure 5). Il a été mis en évidence de façon remarquable que l'HGF/SF est capable de modifier l'organisation des cellules épithéliales. En fait, le HGF/SF est capable *in vitro* d'induire la dispersion et la morphogenèse des cellules épithéliales ; deux réponses biologiques fortement dépendantes du mode de culture et qui a priori semblent impliquer des processus distincts.

(b) Dispersion des cellules épithéliales

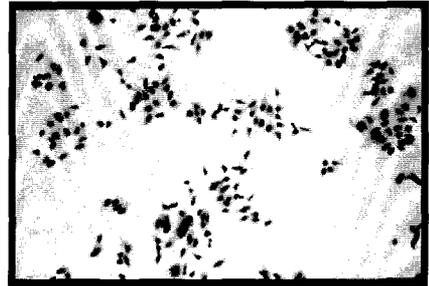
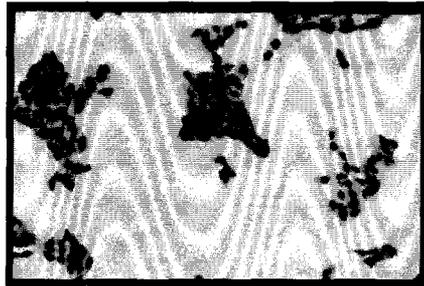
La plupart des cellules épithéliales, cultivées à basse densité sur plastique, s'organisent en îlots compacts. Sur ce type de culture, l'HGF/SF, l'EGF ou le FGF sont capables d'induire la dispersion des cellules constituant un îlot. Cependant, l'HGF/SF est le facteur de croissance qui induit le plus efficacement la dispersion et ce sur un grand nombre de cellules épithéliales.

Les étapes de ce processus ont été bien décrites sur les cellules épithéliales MDCK (Madin Darby Canine Kidney) issues d'un rein de chien, qui se dispersent clairement suite à la stimulation par l'HGF/SF (Figure 6). La dispersion induite par le l'HGF/SF sur les cellules épithéliales MDCK est à son maximum après environ 12 heures de traitement. Pendant ce laps de temps, le phénomène peut être décomposé en événements distincts. Durant les 4 premières heures de traitement par l'HGF/SF, les cellules s'étaient et la surface occupée par une colonie de cellule peut être multipliée entre trois et cinq fois. Durant cet étalement, le réseau d'actine composant le cytosquelette subit de profondes modifications, qui ont notamment pour conséquence l'apparition d'extensions cellulaires riches en filaments d'actine appelées lamellipodes. Entre 4 et 6 heures de traitement, les cellules se désolidarisent les unes des autres. Les jonctions adhérentes, assurées par les E-cadhérines sont perdues en premier, puis suivent les jonctions serrées et enfin les jonctions adhérentes, assurées par les desmosomes. De plus, les cellules en périphérie de l'îlot se séparent de la colonie par une migration active. Après 12 heures de traitement, la réorganisation du cytosquelette et la perte des jonctions, associées au déplacement des cellules ont pour conséquence un effet global d'éparpillement des cellules (Potempa and Ridley, 1998; Ridley et al., 1995)

—

HGF/SF

Dispersion



Morphogenèse
de branchement

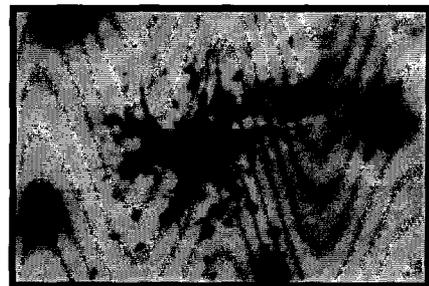
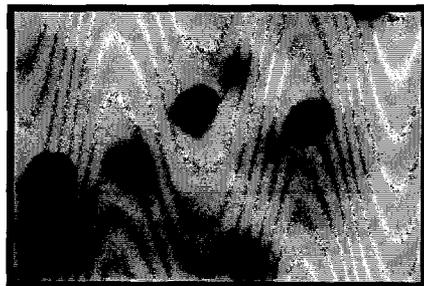


Figure 6: Dispersion et morphogenèse induites par l'HGF/SF sur les cellules épithéliales MDCK

(c) Morphogenèse des cellules épithéliales

Lorsque les cellules épithéliales MDCK sont cultivées pendant plusieurs jours au sein d'un gel de collagène, elles s'organisent en structure sphérique, comparable à un kyste. Sur ces structures, l'HGF/SF induit la formation de branchements, constituées de nombreuses cellules jointives qui pénètrent dans le gel. La réponse est maximale au bout de 10 à 20 jours (Figure 6) (Montesano et al., 1991). Sur les cellules MDCK, l'HGF/SF induit donc la morphogenèse de branchement.

D'autres types de morphogenèse ont été observés à partir d'autres cellules épithéliales. De manière intéressante, ces structures élaborées *in vitro*, suite à la stimulation par l'HGF/SF, se rapprochent de celles que les cellules sont capables de former *in vivo*. Par exemple, sur des cellules issues de la glande mammaire, l'HGF/SF induit la formation de structures tubulaires, alors que sur des cellules issues de poumons, l'HGF/SF induit la formation de structures d'allure alvéolaire (Brinkmann et al., 1995). Ces résultats ont permis aux auteurs de proposer que l'HGF/SF ne soit pas un facteur « instructif », mais un facteur « inductif » ; l'HGF/SF activerait un « programme » de morphogenèse spécifique au type cellulaire.

Les mécanismes mis en place durant la morphogenèse induite par l'HGF/SF sont mal connus. Pourtant de façon générale, les auteurs considèrent que la morphogenèse nécessite la dissociation, la migration et la prolifération des cellules épithéliales.

3) Régulation transcriptionnelle induite par l'HGF/SF

Il a été montré que la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, bloque de façon très précoce la dispersion induite par l'HGF/SF sur les cellules MDCK (Ridley et al., 1995). La synthèse de nouvelles protéines ou le renouvellement des protéines déjà présentes est donc indispensable pour cette réponse biologique. Les gènes cibles, permettant les réponses biologiques induites par l'HGF/SF, commencent à être connus. Ils comprennent notamment des gènes impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire, des facteurs de transcription et MET.

Sur les cellules MDCK ou sur des kératinocytes, l'HGF/SF est capable d'induire l'expression des métalloprotéinases comme la collagénase 1 (MMP-1), la stromélysine 1 (MMP-

3) (Dunsmore et al., 1996; Fafeur et al., 1997), ou la MMP-9 (McCawley et al., 1998), mais aussi de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'activation de protéases, comme « urokinase-type plasminogen activator »(uPA) ou le récepteur de l'uPA (Pepper et al., 1992). Inversement, l'HGF/SF induit aussi l'expression de gènes codant pour des inhibiteurs de protéases comme le « plasminogen activator inhibitor » (Pepper et al., 1992), ou le « tissue inhibitor of metalloproteinases 3 »(TIMP-3) (Castagnino et al., 1998).

Il est attractif de proposer que les protéases induites par l'HGF/SF soient impliquées dans les processus de remodelage des structures épithéliales ; la dégradation de la matrice extracellulaire favoriserait le déplacement des cellules. Pour la MMP-9, une relation de cause à effet a été établie entre la motilité et l'induction de l'expression de la protéase par l'HGF/SF. En effet, sur des kératinocytes la dispersion induite par l'HGF/SF corrèle avec l'expression de la MMP-9. De plus, un anticorps bloquant, dirigé contre la MMP-9, inhibe la dispersion induite par l'HGF/SF (McCawley et al., 1998). Inversement, toujours sur des kératinocytes, l'HGF/SF induit l'expression d'un inhibiteur des metalloprotéases (TIMP-3). Dans ce cas, c'est la surexpression de TIMP-3 qui abolit la dispersion induite par l'HGF/SF. Ces résultats suggèrent que la régulation de l'expression par l'HGF/SF d'au moins deux protéines, impliquées dans les processus de dégradation de la matrice extracellulaire, joue un rôle important dans la dispersion (Castagnino et al., 1998).

L'HGF/SF favorise l'expression de facteurs de transcription tels que ETS1 (Fafeur et al., 1997), les facteurs AP1 FOS et JUN (Boccaccio et al., 1994) et SLUG (Savagner et al., 1997). Nous discuterons plus longuement par la suite de l'implication du facteur de transcription ETS1.

Le rôle des facteurs de transcription FOS et JUN, dans les réponses biologiques induites par l'HGF/SF, n'est pas élucidé. En revanche, il est établi que l'activation de l'un ou de l'autre facteur a d'importantes conséquences sur l'organisation des cellules épithéliales. En effet, l'activation inductible de FOS ou de JUN provoque la dépolarisation et la dissociation de cellules épithéliales de glandes mammaires (Fialka et al., 1996; Reichmann et al., 1992).

La surexpression de SLUG, dans des cellules issues d'un carcinome de rat, induit l'étalement et la perte des jonctions assurées notamment par les desmosomes. Néanmoins, quelques contacts intercellulaires sont conservés et les cellules ne se déplacent pas. Inversement, la transfection d'ADNc anti-sens de SLUG empêche la dispersion induite par l'HGF/SF. Il

semble donc que le facteur de transcription SLUG soit impliqué dans la dispersion et plus précisément durant l'étape d'étalement (Savagner et al., 1997).

L'HGF/SF est également capable d'induire l'expression de son propre récepteur (Boccaccio et al., 1994). Ainsi la stimulation par l'HGF/SF favoriserait la synthèse de MET qui permettrait une meilleure inductibilité des cellules.

4) Implication du couple HGF/SF-MET durant le développement

(a) Extinction des gènes de l'HGF/SF et de MET ; transformation *in vivo* des essais obtenus *in vitro*

En 1995, l'inactivation des gènes de l'HGF/SF et de MET chez la souris ont donné des informations décisives sur leur implication durant le développement. De manière générale, les équipes ayant inactivés le gène de l'HGF/SF et le gène de MET ont mis en évidence les mêmes anomalies sur l'embryon de souris (Bladt et al., 1995; Schmidt et al., 1995 ; Uehara et al., 1995). Les souris MET^{-/-} ou HGF/SF^{-/-} meurent *in utero* à environ 15 jours de développement. Le placenta présente des défauts d'organisation, la taille du foie est réduite, les cellules musculaires des bourgeons des membres, du diaphragme et du sommet de la langue sont inexistantes.

Les défauts au niveau du placenta semblent responsables de la mort des embryons, sans doute suite à un dysfonctionnement du transport des nutriments et de l'oxygène. Le phénotype est la conséquence d'une réduction du nombre de trophoblastes qui expriment normalement MET. L'inactivation du gène de l'HGF/SF (Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995) ou celui du récepteur MET (Bladt et al., 1995) empêcherait le contrôle de la prolifération des trophoblastes par les cellules mésenchymateuses adjacentes ; les cellules allantoïdes qui expriment l'HGF/SF (Uehara et al., 1995). Ces résultats confirment l'hypothèse initiale basée sur les localisations complémentaires de MET et de son ligand : le couple semble jouer un rôle important pour les interactions épithélium/mésenchyme.

La réduction de la taille du foie provient quant à elle de la réduction du nombre d'hépatocytes, néanmoins la structure globale du foie n'est pas affectée (Schmidt et al., 1995). L'implication de l'HGF/SF et de MET durant le développement du foie est en accord avec le puissant effet mitogène obtenu par l'HGF/SF sur les hépatocytes (hepatocyte growth

factor !)(Nakamura et al., 1984) et leur très large expression dans le foie. Il est intéressant de noter que l'implication du couple dans la constitution du foie ne se limite pas au développement. En effet, l'HGF/SF semble jouer un rôle important pour la reconstitution du foie, lors de pathologies chez l'adulte.

Pour le défaut au niveau des cellules musculaires, c'est la migration de précurseurs à partir du dermomyotome qui semble perturbée. En effet, les cellules musculaires des bourgeons de membres, du diaphragme, et du sommet de la langue ont pour précurseur commun des myoblastes issus du dermomyoderme des somites. Chez les souris MET^{-/-} ou HGF/SF^{-/-} ces précurseurs, exprimant habituellement MET (Sonnenberg et al., 1993), existent mais sont incapables de migrer et ne peuvent pas, par conséquent, coloniser les organes cibles (Bladt et al., 1995). On le sait, l'HGF/SF a une activité motogène importante (scatter factor !)(Stoker et al., 1987) ; cette activité semble nécessaire *in vivo*, à la migration de certains précurseurs de cellules musculaires.

Les défauts observés *in vivo* corroborent, très largement, les hypothèses fonctionnelles issues des patrons d'expressions et/ou les réponses induites *in vitro* par l'HGF/SF. Ainsi, ce qui est rare pour un facteur de croissance, l'HGF/SF porte bien son nom.

(b) Remplacement chez la souris du gène codant MET par une version mutée, MET GRB2^(c)

Comme nous l'aborderons plus longuement, la spécificité de la transmission du signal ne tient parfois qu'à un seul acide aminé. Ainsi, le remplacement sur MET, dans la partie intracellulaire, de la séquence Y¹³⁵⁶VNV par la séquence Y¹³⁵⁶VHV provoque la perte spécifique du recrutement de la protéine GRB2, alors que le recrutement d'autres protéines ne semble pas modifiée. Cette forme mutante de MET a été baptisée MET GRB2^(c).

Le remplacement chez la souris, du gène codant MET, par la séquence nucléotidique codant le récepteur MET GRB2^(c), a permis de révéler de nouvelles implications de MET durant le développement. En effet, les souris MET GRB2^(c) présentent une réduction des muscles des membres. Ce défaut correspond à un de ceux observés chez les souris MET^{-/-}, alors que les autres dysfonctionnements ne sont pas retrouvés. Néanmoins, alors que dans les souris MET^{-/-} c'est la perte des capacités migratoires des myoblastes qui est responsable du phénotype, dans les souris

MET GRB2^(c) c'est la prolifération des myoblastes durant leur migration qui est perturbée (Maina et al., 1996).

On peut donc proposer que les phénotypes dramatiques obtenus par l'inactivation des gènes de MET et de l'HGF/SF masquent d'autres implications biologiques du couple. Il est peu risqué de parier, que plus tard dans le développement ou chez l'adulte, il sera mis en évidence d'autres rôles pour l'HGF/SF et MET.

(c) L'épineux problème de la mise en place d'organes à structure épithéliale

L'HGF/SF a des capacités remarquables à induire *in vitro* la morphogenèse des cellules épithéliales (Brinkmann et al., 1995). De plus, l'HGF/SF et MET sont exprimés dans des organes où les tissus épithéliaux forment des structures tubulaires complexes (Sonnenberg et al., 1993). Enfin, des informations fonctionnelles ont permis la mise en évidence de l'implication de l'HGF/SF et de MET durant l'organogenèse. En effet, des anticorps bloquants, dirigés contre l'HGF/SF, utilisés sur une culture organotypique de rein embryonnaire, ont perturbé la morphogenèse des tissus épithéliaux (Santos et al., 1994; Woolf et al., 1995). Plus tard, soit en utilisant des anticorps bloquants, soit en utilisant des oligonucléotides antisens, perturbants la synthèse de l'HGF/SF, l'implication du facteur de croissance a été mise en évidence lors de la morphogenèse, obtenue à partir de cultures organotypiques de glandes mammaires, de poumons ou de dents (Ohmichi et al., 1998; Tabata et al., 1996; Yang et al., 1995).

Pourtant, chez les souris HGF/SF^{-/-} ou MET^{-/-}, ces organes ne présentent aucune anomalie ni dans leur taille ni dans leur structure, jusqu'à la mort des embryons à environ 15 jours de développement. Ces résultats soulèvent la question de la mise en jeu de mécanismes de compensation, qui permettraient la mise en place de ces organes sans l'implication du couple HGF/SF-MET.

5) Implication du couple HGF/SF-MET dans la tumorigenèse

Le récepteur MET a été découvert grâce aux capacités transformantes de la fusion TPR-MET, mais le réarrangement TPR-MET n'a jamais été identifié dans des cancers naturels. Par contre, la dérégulation des fonctions du couple HGF/SF-MET pourrait être un événement essentiel dans le processus de tumorigenèse d'une grande variété de tissus épithéliaux.

		MET	HGF/SF
Poumon Plèvre Sein	Olivero, et al.,1996 Harvey, et al.,1996 Tuck, et al.,1996	Surex. prot. Surex. prot. Surex. ARNm et prot.	Surex. prot. Surex. prot. Surex. ARNm
Ovaire Thyroïde Colon et Rectum	Renzo, et al.,1994 Ruco , et al.,1996 Di Renzo, et al.,1995	Surex. prot. Surex. prot. Surex. prot. Amplification du gène	
Estomac	Taniguchi, et al.,1997		Augmentation du taux sérique Surex. prot.
Sarcomes (Os,muscle, Cartilage)	Rong, et al.,1993	Surex. prot.	
Sarcome de Kaposi	Polverini, et al.,1995	Surex. prot.	Surex. prot.
Cerveau Rein	Rosen, et al.,1996 Natali, et al.,1996 Bardelli, et al.,1997	Surex. prot. Mutation	Surex. prot.
Prostate	Pisters, et al.,1995	Surex. prot.	

Tableau 1 : Le couple HGF/SF-MET est impliqué dans des cancers chez l'Homme.

L'argumentation de l'implication du couple SF/HGF-MET dans ces cancers épithéliaux ou mésenchymateux repose sur une surexpression de la protéine MET ou de l' HGF/SF (Surex .prot), sur une surexpression de l'ARN messager de MET ou de l'HGF/SF (Surex. ARNm), une augmentation du taux sérique de l'HGF/SF. Plus rarement sont observées une amplification ou une mutation du gène de MET.

Dans les tissus tumoraux de certains cancers chez l'Homme, une surexpression du récepteur MET et/ou l'HGF/SF peut être retrouvée (Tableau 1). En fait, il semble que la surexpression de MET et/ou de son ligand aboutisse à une boucle d'activation autocrine, qui est à l'origine de l'activation de MET. De la même façon, une transfection stable permettant l'expression de l'HGF/SF dans des cellules épithéliales exprimant MET (Rong et al., 1992), ou inversement une transfection stable de MET dans des fibroblastes exprimant HGF/SF (Johnson et al., 1995; Kanda et al., 1993), confèrent aux cellules des capacités tumorigènes.

De façon moins fréquente, le récepteur MET peut également être activé par des mutations. Ainsi des mutations ponctuelles de MET induisant l'activation constitutive du potentiel tyrosine kinase du récepteur sont associées à un carcinome héréditaire du rein (Bardelli et al., 1997).

II. Signalisation induite par le récepteur MET

Une question cruciale consiste à se demander comment les voies de signalisation induites par un facteur extracellulaire contribuent aux réponses biologiques. En d'autres termes, comment une cellule transforme-t-elle un stimulus en réponse biologique complexe ?

Le cas de l'HGF/SF fait figure d'exemple. En effet, au fur et à mesure que les mécanismes d'activation de MET et des voies de signalisation en aval ont été mieux décryptés, leurs influences sur les réponses biologiques ont été mises en évidence. Sur les cellules épithéliales, comme les MDCK, les auteurs ont notamment étudié la dispersion et la morphogénèse de branchement. Sur les fibroblastes, les auteurs ont étudié l'implication des voies de signalisation induites par TPR-MET, lors de la transformation.

Suite à la stimulation par l'HGF/SF, le premier événement permettant la propagation de l'information est l'activation du récepteur MET. Les mécanismes d'activation du récepteur, notamment par autophosphorylation de résidus tyrosines, ont été largement étudiés, de même que leurs implications dans les réponses biologiques.

A. Initiation de voies de signalisation par MET

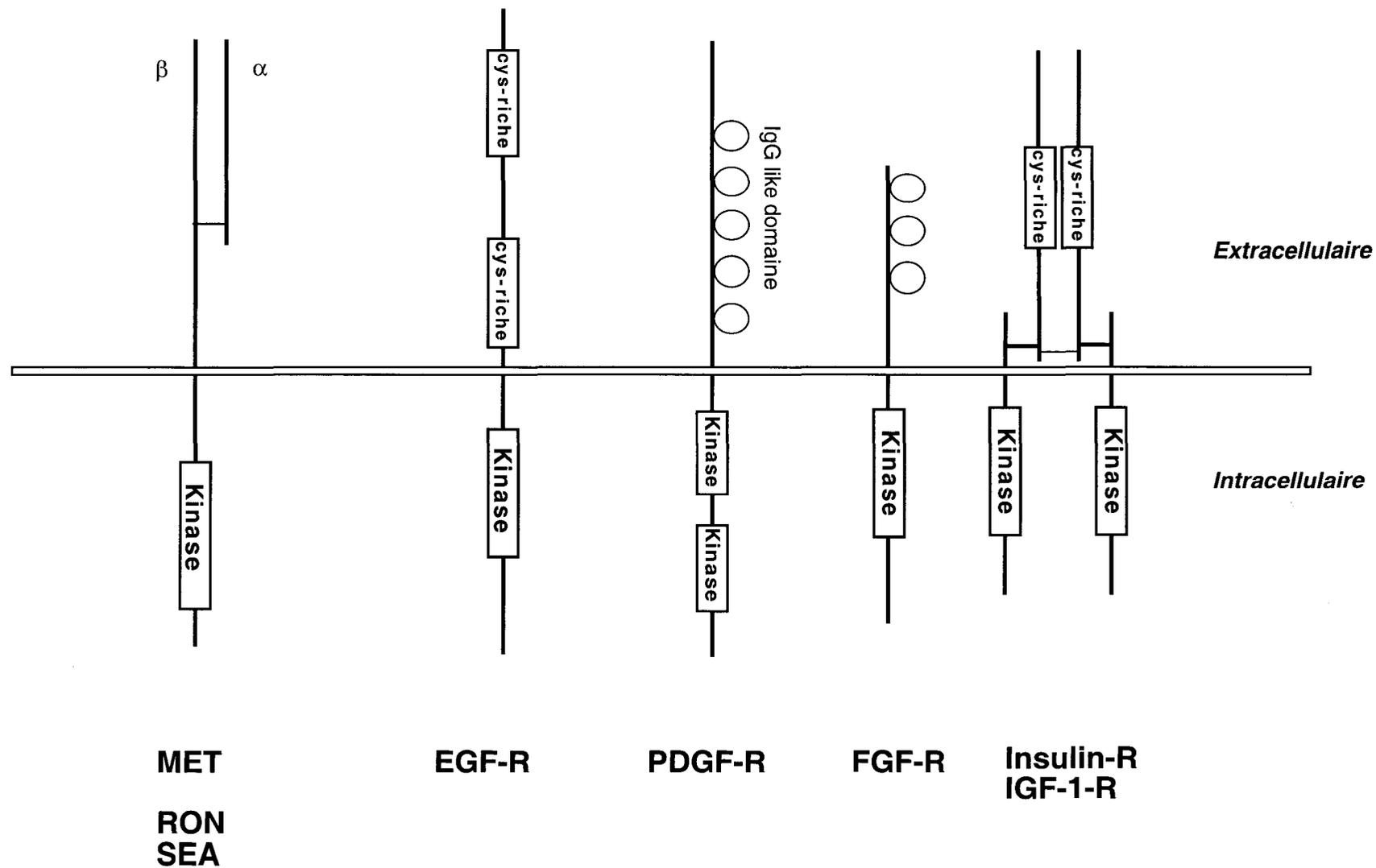


Figure 7: Représentation schématique de MET, RON et SEA et de cinq autres récepteurs à activité tyrosine kinase

1) Structure et activation des récepteurs tyrosines kinases

Les récepteurs tyrosines kinases sont constitués d'un domaine juxtamembranaire, séparant une région extracellulaire capable d'interagir avec un ligand spécifique, et une région intracellulaire portant l'activité tyrosine kinase. Les régions extracellulaires sont constituées de nombreux types de domaines ; il peut s'agir par exemple de domaines « immunoglobulin-like » ou de domaines riches en cystéines. Les domaines tyrosines kinases des régions intracellulaires, constitués de 11 sous-domaines, sont quant à eux bien conservés entre les différents récepteurs. Sur la base de leur caractéristique structurale, les récepteurs tyrosines kinase peuvent être classés en famille. Quelques exemples représentatifs sont illustrés sur la figure 7.

Selon un processus qui semble général aux récepteurs de type tyrosine kinase, la fixation du ligand sur la région extracellulaire permet leur activation par phosphorylation et l'initiation de voies de signalisation intracellulaires (Heldin, 1995).

Des données fonctionnelles, associées aux données de structure cristalline obtenues sur le domaine tyrosine kinase du récepteur à l'insuline ou du récepteur au FGF ont permis de modéliser leur activation. Deux sous-domaines du domaine tyrosine kinase s'organisent en boucle, dont le positionnement par rapport au site de fixation de l'ATP, conditionne l'activité catalytique du récepteur. En situation non activée, la boucle masque le site de liaison de l'ATP, réduisant ainsi l'activité catalytique. En situation activée, deux tyrosines contigues du domaine catalytique, conservées parmi les récepteurs, sont phosphorylées. Il s'en suit un changement de conformation de la boucle qui libère le site de fixation de l'ATP. L'activité catalytique du récepteur est alors maximale. La fixation du ligand sur les récepteurs tyrosines kinases permet le rapprochement des récepteurs « au repos ». Leur faible activité tyrosine kinase permettrait tout de même leur autophosphorylation sur les résidus tyrosines et notamment sur ceux situés dans le domaine catalytique. La phosphorylation de ces résidus libérerait le site de fixation de l'ATP et assurerait une autophosphorylation complète des récepteurs. D'autres résidus tyrosines situés hors du domaine kinase sont alors phosphorylés (pour revue voir (Hubbard et al., 1998)). Ces résidus tyrosines phosphorylés sont capables d'interagir avec des protéines cytoplasmiques qui seront à la base de voies de signalisation intracellulaires.

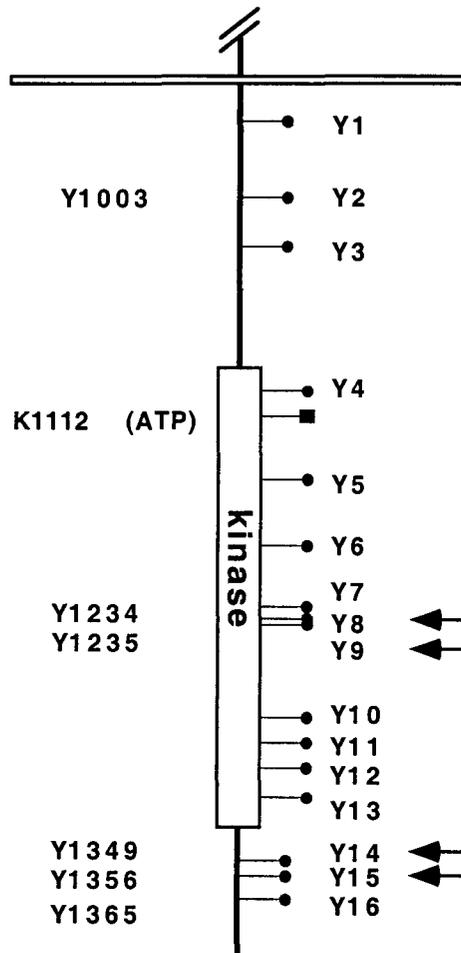


Figure 8: Représentation schématique des résidus tyrosines de la partie intracellulaire de MET. Les résidus tyrosines sont numérotés de 1 à 16 et sont accompagnés d'une flèche lorsqu'ils sont autophosphorylés, lors de l'activation du récepteur.

2) Activation du potentiel tyrosine kinase de MET

(a) La liaison de l'HGF/SF à MET

MET est le récepteur à haute affinité de l'HGF/SF ($k_D=5-25$ pM) (Naldini et al., 1991; Rubin et al., 1993). L'extrémité N-terminale de l'HGF/SF, précédant les domaines « kringle », est responsable de l'interaction avec MET (Lokker et al., 1992; Okigaki et al., 1992). Il semble cependant que la partie C-terminale soit également impliquée dans l'interaction avec le récepteur. En effet, des produits d'épissages alternatifs de l'HGF/SF, tronqués dans la partie C-terminale de la chaîne β , sont incapables d'induire l'activation des récepteurs (Chan et al., 1991).

D'autre part, il existe à la surface des cellules des récepteurs de basse affinité pour l'HGF/SF ($k_D=0,2-5$ nM). Il s'agit de protéoglycanes sulfatés de type héparine, qui favoriseraient l'organisation des molécules d'HGF/SF en structures oligomériques, et faciliteraient la dimérisation des récepteurs MET (Zioncheck et al., 1995).

(b) Autophosphorylation de MET ; implication des tyrosines 8 et 9 dans l'activité catalytique

Suite à la liaison de l'HGF/SF les récepteurs MET s'autophosphorylent sur des résidus tyrosines. Pour faciliter la lisibilité, nous utiliserons une numérotation simplifiée des résidus tyrosines de MET, dans laquelle les résidus tyrosines de la partie intracellulaire de MET sont numérotés de 1 à 16. Leur position dans la séquence de MET est schématisée sur la figure 8.

La protéine MET activée est majoritairement phosphorylée sur les résidus tyrosines 8 et 9 du domaine catalytique, conservés dans de nombreux récepteurs tyrosine kinases (Ferracini et al., 1991; Longati et al., 1994) (Figure 8). Comme pour la plupart de ces récepteurs, la mutation de l'un ou des deux résidus abolit l'activité catalytique de MET (Longati et al., 1994).

De façon à déterminer l'implication de ces deux résidus tyrosines, lors de réponses biologiques telles que la dispersion ou la morphogénèse induite par l'HGF/SF, de nombreuses équipes se sont lancées dans l'élaboration de récepteurs chimères. Ces récepteurs sont tous constitués de la partie transmembranaire et intracellulaire du récepteur MET et de la partie extracellulaire d'un récepteur que la cellule n'exprime pas. Dans des cellules transfectées par de telles chimères, la stimulation par le ligand correspondant à la partie extracellulaire, permet

l'autophosphorylation de la partie intracellulaire de MET et par conséquent l'activation des voies de signalisation spécifiques à MET.

Les deux premières équipes ayant construit des récepteurs chimères les ont d'abord utilisés pour prouver l'implication de la partie intracellulaire du récepteur MET dans la dispersion et la morphogénèse de branchement de cellules épithéliales. Une chimère TRK-MET, constituée de la partie extracellulaire du récepteur au NGF fusionnée à la partie intracellulaire de MET, a permis à M. Weidner et ses collaborateurs de montrer en 1993 que des cellules épithéliales MDCK, transfectées par cette chimère, se dispersent et font de la morphogénèse de branchement sous l'action du NGF, comme elles le feraient avec de l'HGF/SF (Weidner et al., 1993). La même année, une chimère EGFR-MET a permis d'obtenir des conclusions similaires (Komada and Kitamura, 1993). Dans la foulée, les auteurs ont également montré que leurs chimères EGFR-MET, dont le résidu tyrosine 9 (site de phosphorylation majoritaire de MET) est remplacé par un résidu non phosphorylable, est incapable d'induire la dispersion de cellules épithéliales (Komada and Kitamura, 1994). Plus tard, deux équipes ont précisé que les deux résidus (8 et 9) sont nécessaires pour la dispersion et la morphogénèse de branchement des cellules épithéliales (Weidner et al., 1995; Zhu et al., 1994).

Les résidus tyrosine 8 et 9, situés dans région catalytique du récepteur MET, sont donc deux sites majoritairement phosphorylés. Ils sont indispensables pour l'activité tyrosine kinase du récepteur et sont logiquement requis pour induire les réponses biologiques.

3) Site de liaison multisubstrat impliquant les tyrosines phosphorylées 14 et 15

(a) Recrutement de protéines cytoplasmiques

En 1993, C. Ponzetto et ses collaborateurs identifient deux autres sites d'autophosphorylation sur le récepteur MET dont l'intensité de phosphorylation est moins importante que les résidus 8 et 9. Il s'agit des résidus 14 et 15 de la région C-terminal de MET (Ponzetto et al., 1993). En fait ces deux résidus tyrosines phosphorylés sont impliqués dans le recrutement de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Ponzetto et al., 1993) dont l'interaction avec MET avait été identifiée deux ans plus tôt (Graziani et al., 1991). Depuis, il a été montré que de nombreuses autres protéines sont capables de se lier à ces deux résidus voisins. Ces effecteurs directs de MET sont notamment GRB2, SRC, PI3K, PLC γ , SHC, GAB1 et STAT3 (Figure 9). Le

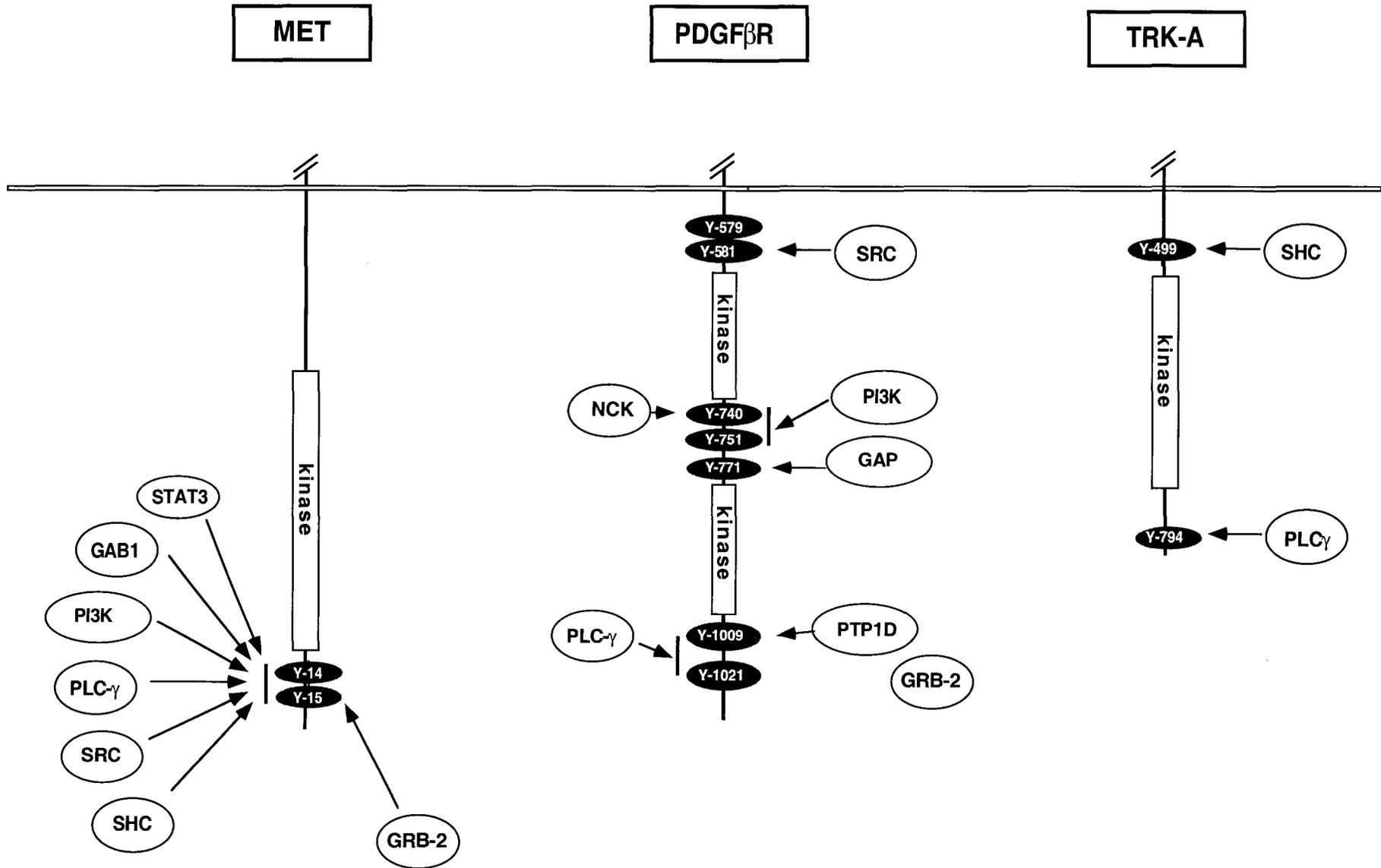


Figure 9: Recrutement de protéines cytoplasmiques par les résidus tyrosines phosphorylés des récepteurs MET, PDGFβR et TRKA

recrutement de l'ensemble de ces protéines sur deux résidus tyrosines proches a amené P. Comoglio à baptiser la région entourant ces deux résidus « site d'ancrage multisubstrat » (Ponzetto et al., 1994).

(b) Originalité du site d'ancrage multisubstrat de MET

La majorité des récepteurs tyrosine kinase ont en commun, dans leur domaine kinase, un ou deux des résidus tyrosines nécessaires à l'activité kinase. En revanche, la localisation des résidus tyrosines autophosphorylés responsable du recrutement secondaire des protéines cytoplasmiques varie de façon importante. Les capacités de recrutement de ces résidus sont également très variables.

Pour exemple, le récepteur PDGF β R compte huit résidus tyrosines autophosphorylés situés hors du domaine kinase, répartis sur l'ensemble de la partie intracellulaire. Il a été montré que les huit résidus sont tous capables de lier une, deux ou au maximum trois protéines cytoplasmiques (Figure 9). Le récepteur TRKA (récepteur du NGF) possède quant à lui deux résidus tyrosines phosphorylés; un résidu situé dans la région juxtamembranaire et un autre situé dans région C-terminale. Chacun des résidus lie une seule protéine cytoplasmique, jusqu'à preuve du contraire (Figure 9).

Le site d'ancrage de MET, constitué de deux résidus tyrosines proches (séparé par sept acides aminés), est capable de lier au moins sept protéines. Ce mécanisme de recrutement sur un site unique d'une multitude de protéines de signalisation est original par rapport aux autres récepteurs tyrosines kinases et pose donc un problème pour la compréhension de l'organisation des recrutements.

4) Le site de liaison multisubstrat joue un rôle crucial dans les réponses biologiques induites par MET

(a) La danse des récepteurs chimères MET

Comme pour les résidus tyrosines 8 et 9, l'implication des tyrosines 14 et 15 a été étudiée lors de la dispersion et la morphogénèse des cellules épithéliales, grâce à la stratégie des

	M. Park	M. Weidner					P. Comoglio		
Chimère	CSF-MET (Zhu et al, 1994)	Chimère TRK-MET (Weidner et al, 1995)					Chimère TRK-MET (Ponzetto et al , 1996)		
Mutation									
Y→F	Y15	Y14	Y15	Y14- 15	Y2	Y16	Y14	Y15	Y14- 15
Disp.	0	+	+	↓	D	+	↓	↓	0
Morpho.	0	↓	↓	0	+	↓			

Réponse induite par le ligand

+: Conservation ↓: Diminution 0: Abolition D : Phénotype constitutivement dissocié:

Tableau 2: Synthèse des résultats obtenus sur la dispersion (disp.) et la morphogénèse de branchement (morph.) des cellules MDCK transfectées par des récepteurs chimères mutés sur des résidus tyrosines.

récepteurs chimères. Trois équipes, sont entrées en concurrence sur ce sujet et ont chacune donné leur version des faits. Dans leur globalité les résultats vont dans le même sens ; les deux tyrosines sont importantes pour les réponses biologiques, cependant dans le détail des contradictions éveillent l'intérêt.

C'est l'équipe québécoise de M. Park qui ouvre le bal. En effet, son équipe démontre, en utilisant une chimère CSFR-MET, que la tyrosine 15 est absolument nécessaire à la dispersion et la morphogenèse des cellules épithéliales MDCK (Zhu et al., 1994).

L'année suivante M. Weidner et ses collaborateurs, en Allemagne, contredisent l'information en montrant que la mutation simple de la tyrosine 15 ou 14 diminue la morphogenèse de branchement sans l'abolir et que la dispersion n'est pas affectée. De plus, ils montrent que la double mutation des tyrosines 14 et 15 abolit la morphogenèse de branchement mais pas la dispersion. D'autre part, ils mettent à jour l'implication de deux autres résidus tyrosines dont l'autophosphorylation n'a pas été détectée. En effet, la mutation de la tyrosine 2, située dans la région juxtamembranaire, induit un phénotype dissocié, suggérant son implication dans une régulation négative. De plus, la mutation de la tyrosine 16, située à l'extrémité C-terminale, perturbe sensiblement la morphogenèse (Weidner et al., 1995).

L'année d'après, c'est l'équipe italienne de P. Comoglio qui entre dans la danse avec un récepteur chimère TRK-MET (comparable à celui de M. Weidner). Leurs résultats montrent que la mutation simple de la tyrosine 14 ou 15 sur le récepteur TRK-MET diminue la dispersion sans l'abolir et que la mutation des deux résidus permet d'abolir la dispersion (Ponzetto et al., 1996) (il n'y a pas d'informations sur la morphogenèse de branchement).

De façon synthétique, la morphogenèse peut toujours être bloquée, mais selon les équipes l'abolition nécessite la mutation d'un ou des deux résidus du site multisubstrat. Pour la dispersion, une équipe montre que la mutation d'un résidu peut suffire pour l'abolir, alors que pour une autre la mutation des deux résidus diminue, mais n'abolit pas le processus. Les résultats sont résumés dans le tableau 2.

Une explication possible de ces contradictions peut résider dans la difficulté à évaluer objectivement des réponses biologiques comme la dispersion ou la morphogenèse de branchement. Quoi qu'il en soit en mettant de côté ces contradictions, il est dès lors admis que les deux tyrosines de la partie C-terminale de MET jouent un rôle crucial dans l'induction des réponses biologiques.

(b) Les exemples du récepteur PDGF β R et du récepteur FGFR1

Des travaux d'identification et de mutations des résidus tyrosines phosphorylés ont également été entrepris sur de nombreux autres récepteurs tyrosines kinases. Le récepteur au PDGF (PDGF β R) et le récepteur au FGF1 (FGFR1) me paraissent deux exemples significatifs. En effet, l'influence des mutations des résidus tyrosines phosphorylés a donné lieu à des conclusions diamétralement opposées et rendent compte de la diversité de fonctionnement au sein de la famille des récepteurs tyrosines kinases, ayant des mécanismes de signalisation a priori proches.

Sur le récepteur FGFR1 quatre résidus tyrosines phosphorylés ont été identifiés hors du domaine kinase en position 463, 583, 730 et 766. Seule la tyrosine 766 est capable de lier une protéine cytoplasmique (Mohammadi et al., 1996). L'influence des mutations des tyrosines phosphorylées du récepteur au FGF1 a été évaluée notamment dans les cellules PC12 ; le FGFR1 transfecté et activé induit une différenciation neuronale. La mutation des quatre résidus tyrosines du récepteur FGFR1 n'a aucune conséquence sur cette différenciation (Mohammadi et al., 1996). Ce résultat démontre que le récepteur au FGF1 est capable d'induire des voies de signalisation menant à des réponses biologiques sans mettre en jeu la phosphorylation de résidus tyrosines.

Le récepteur au PDGF β (PDGF β R) s'autophosphoryle, quant à lui, sur huit résidus tyrosines. Tous ces résidus sont capables de recruter des protéines cytoplasmiques (Figure 9). L'influence des mutations de ces résidus tyrosines a été évaluée sur différentes réponses biologiques que le PDGF est capable d'induire selon le type cellulaire. Dans toutes les expériences la réponse biologique a été abolie par la mutation d'un ou plusieurs des résidus tyrosines (pour revue (Claesson-Welsh, 1994). Dans le cas du récepteur PDGF β R les résidus tyrosines semblent nécessaires à la transmission de l'information menant aux réponses biologiques.

Sous l'éclairage de ces résultats, il semble que le récepteur MET ait le même comportement que le récepteur au PDGF β ; les résidus tyrosines phosphorylés, en dehors du domaine tyrosine kinase, semblent nécessaires à l'obtention des réponses biologiques.

5) Le site de liaison multisubstrat est nécessaire pour la transformation

Les sites d'autophosphorylation de TPR-MET semblent les mêmes que MET. En effet, TPR-MET est majoritairement phosphorylé sur les résidus 8 et 9 (Rodrigues and Park, 1994), alors que les résidus tyrosines 14 et 15 sont plus faiblement phosphorylés (Kamikura et al., 1996).

Parallèlement au récepteur MET, un travail équivalent de mutagenèse des résidus tyrosines phosphorylés a été mené sur l'oncogène TPR-MET. La substitution des résidus tyrosines 8 et 9 du domaine kinase, en résidus non phosphorylables, démontre leur nécessité à la fois pour l'activité tyrosine kinase et pour les capacités transformantes de TPR-MET (Rodrigues and Park, 1994).

Pour les résidus tyrosines C-terminaux, les résultats indiquent que la mutation de la tyrosine 14 de TPR-MET réduit d'environ 50% la capacité de transformation mesurée par l'obtention de colonies, celle de la tyrosine 15 réduit la transformation de 90%, et la transformation est nulle quand les deux résidus sont mutés (Fixman et al., 1995; Ponzetto et al., 1994). Ces résultats confirment ceux obtenus avec les chimères MET et soulignent une fois de plus le rôle crucial des résidus de la partie C-terminale dans les réponses biologiques.

Certaines équipes travaillent sur MET et TPR-MET en parallèle et des résultats obtenus sur TPR-MET sont régulièrement utilisés comme arguments pour MET et inversement. Ce fait est révélateur de l'état d'esprit des auteurs, qui considèrent que MET et TPR-MET induisent des voies de signalisation équivalentes. Pourtant TPR-MET, par l'absence de domaine juxtamembranaire, n'est pas localisé à la membrane et leurs parties intracellulaires ne sont pas strictement identiques (Gonzatti-Haces et al., 1988) (Figure 3).

B. Implication des voies de signalisation dans la dispersion et la morphogénèse induites par l'HGF/SF

Les résidus tyrosines phosphorylés, du récepteur MET activé, permettent le recrutement de nombreux effecteurs, comme GRB2, SHC, PI3K, SRC, STAT3, GAB1 ou PLC γ . L'activation de ces protéines est à l'origine de l'initiation de nombreuses voies de signalisation. Ces voies activées par les récepteurs tyrosines kinases en générales, et par MET en particulier, sont de mieux en mieux décrites. De plus, pour certaines d'entre elles, il a été possible d'évaluer leurs implications dans les réponses biologiques induites par l'HGF/SF.

1) GRB2

(a) Implication du résidu tyrosine 15 pour le recrutement de GRB2

GRB2 est une protéine de 25 kDa capable d'interagir avec les tyrosines phosphorylées de nombreux récepteurs tyrosines kinases, tels que le récepteur à l'EGF ou au PDGF. D'ailleurs GRB2 signifie "growth factor receptor-bound protein 2". la protéine est constituée de trois domaines; deux domaines SH3 et un domaine SH2 (SRC homology domain 3 ou 2, pour leurs caractérisations initiales dans la protéine SRC) (Lowenstein et al., 1992). Le domaine SH3 permet la reconnaissance de régions riches en résidus prolines. C'est ce domaine qui assure la liaison de GRB2 à son acolyte SOS, qui possède dans sa partie C-terminale une région riche en proline (Buday and Downward, 1993; Chardin et al., 1993; Egan et al., 1993; Rozakis et al., 1993). La région SH2, quant à elle, est capable de reconnaître différents motifs contenant un résidu tyrosine phosphorylé. C'est via son domaine SH2 que GRB2 est capable de se lier aux tyrosines phosphorylées des récepteurs tyrosines kinases.

L'interaction de MET activé avec la protéine GRB2 a été mis à jour en 1994, grâce à des expériences de co-immunoprécipitation; GRB2 est immunoprécipité et la protéine MET est détectée par immunoblot (Ponzetto et al., 1994). De plus, des expériences d'association *in vitro* ont montré que seul le récepteur MET, muté sur la tyrosine 15, ne lie pas GRB2, démontrant ainsi que GRB2 interagit avec MET via la tyrosine phosphorylée 15 (Ponzetto et al., 1994). Cette interaction unique avec la tyrosine 15 est particulière pour le récepteur MET puisque les autres protéines recrutées par la partie C-terminale peuvent interagir avec les deux résidus 14 et 15. La liaison spécifique de GRB2 sur la tyrosine 15 est due à la présence en position +2 d'un résidu aspartique (Y¹⁵VNV), compatible avec le domaine SH2 de GRB2, alors que la tyrosine 14 possède en position +2 un résidu histidine (Y¹⁴VHV) (Fournier et al., 1996; Ponzetto et al., 1994; Ponzetto et al., 1996) (Figure 11).

(b) Implication de GRB2 dans les réponses biologiques

La mutation du résidu aspartique situé en position +2 de la tyrosine 15 (Y¹⁵VHV) abolit la fixation de GRB2 à MET. En revanche, les autres protéines, connues au moment des expériences, sont toujours recrutées (Fixman et al., 1996; Fournier et al., 1996; Ponzetto et al., 1996). Ces caractéristiques semblaient être une occasion intéressante pour étudier l'implication de GRB2

dans les réponses biologiques induites par MET. L'étude a été rendue possible par l'utilisation de récepteurs chimères mutés sur le site GRB2 (MET-GRB2^(c)).

Une fois de plus la concurrence est rude et les équipes de M. Park et de P. Comoglio publient des résultats équivalents en 1996. En fait, le récepteur MET-GRB2^(c) est incapable d'induire la morphogenèse de branchement alors que la dispersion est toujours possible (Fournier et al., 1996; Ponzetto et al., 1996). Le résultat est élégant, néanmoins, l'interprétation est délicate. En effet, l'abolition du recrutement de GRB2 par MET ne diminue pas l'activation des kinases ERK, qui sont des kinases intracellulaires dont l'activation est dépendante du recrutement de GRB2. Ainsi, l'interaction directe de GRB2 sur MET, via la tyrosine 15, ne serait pas le mécanisme principal, utilisé par MET, pour activer les kinases ERK (Fournier et al., 1996; Ponzetto et al., 1996). La perte de la morphogenèse de branchement par le récepteurs MET-GRB2^(c) semble donc ne pas pouvoir être expliquée par l'altération de cette voie de signalisation. C'est pourquoi les auteurs imaginent que la mutation du résidu aspartique en position +2 par rapport à la tyrosine 15 perturbe également le recrutement d'autres protéines encore inconnues (Fournier et al., 1996).

L'année suivante, la découverte et la caractérisation de l'adaptateur GAB1 permettent de vérifier l'hypothèse. En effet, l'interaction de GAB1 sur MET est dépendante de la liaison préalable de GRB2 sur les tyrosines en C-terminal (Bardelli et al., 1997; Nguyen et al., 1997). Ainsi, la liaison de GAB1 sur MET est fortement perturbée quand le site de liaison de GRB2 est muté. De plus, comme nous le verrons dans le paragraphe B. 6., GAB1 joue un rôle primordial dans les réponses induites par l'HGF/SF, ce qui expliquerait la perte de fonction obtenue avec le récepteur MET-GRB2^(c).

De façon à découvrir le rôle spécifique de GRB2 dans la transduction du signal, l'équipe de M. Park en collaboration avec J. Schlessinger tente une autre stratégie (Rodrigues et al., 1997). Cette fois, ce sont des mutants de délétions de GRB2 ne possédant pas l'un ou l'autre de ses domaines SH3 qui sont utilisés pour interférer avec les protéines endogènes. Les protéines GRB2 mutantes interagissent toujours, via leur domaine SH2, avec les tyrosines phosphorylées, mais sont incapables d'activer les voies en aval car leur interaction avec SOS est rendu impossible par la perte des domaines SH3. Cette stratégie présente l'avantage d'interférer potentiellement avec toutes les protéines GRB2 recrutées, même celles interagissant avec des intermédiaires. Pourtant les résultats sont décevants. En effet, la surexpression de tels mutants, dans des cellules

transformées par l'oncogène TPR-MET, ne présente pas de réduction de l'activation des kinases ERK. Les auteurs interprètent cet échec par la nécessité qu'aurait la cellule à avoir une activité des kinases ERK suffisante pour assurer sa survie. Ainsi, la sélection ne favoriserait pas l'obtention de clones présentant une réduction de l'activité de la kinaes ERK. En revanche, les cellules transfectées par les mutants de GRB2 présentent d'autres caractéristiques, difficilement interprétables, telles qu'une diminution de l'activité de JNK ou de la PI3K.

(c) Le complexe GRB2-SOS ; facteur d'échange de RAS

Comme les autres récepteurs tyrosines kinases, le récepteur MET activé est capable d'induire l'échange GDP en GTP sur la petite protéine G RAS, ancrée à la membrane, grâce à une queue lipidique (Graziani et al., 1993). La forme activée de RAS (RAS-GTP) est à la base des voies de signalisation qui sont de loin les mieux décrites.

Une année après la caractérisation de GRB2 en 1992, il est démontré que cette protéine interagit avec SOS (Buday and Downward, 1993; Chardin et al., 1993; Egan et al., 1993; Rozakis et al., 1993). Dans le même temps SOS est décrit comme étant le facteur permettant l'échange du GDP en GTP sur la protéine RAS (Chardin et al., 1993). Dès lors, les étapes nécessaires à l'activation de la protéine RAS par les récepteurs tyrosines kinases sont éclaircies. Suite à l'activation d'un récepteur tyrosine kinase, le complexe GRB2-SOS est recruté, ce qui favoriserait sa localisation à proximité de RAS ancré à la membrane : SOS pourrait alors exercer sur la protéine RAS ses talents de facteur d'échange (Figure 11).

Le retour de la protéine RAS-GTP en RAS-GDP est assurée par les protéines GAP (GTPase-activating protein) qui induisent l'hydrolyse du GTP. La protéine à activité GTPase la plus étudiée, capable d'hydrolyser le GTP de RAS, est la protéine GAP^{p120}.

(d) Implication de RAS dans les réponses biologiques

La protéine RAS a été la première molécule de signalisation étudiée pour son influence sur les réponses biologiques induites par l'HGF/SF. Les résultats démontrent que l'activation de RAS est nécessaire à la dispersion des cellules épithéliales. En effet, la surexpression inductible d'une forme inactivée de RAS (RAS N17, incapable de lier le GTP) empêche la dispersion des cellules MDCK induite par l'HGF/SF (Hartmann et al., 1994). Ces résultats ont été confirmés par la

microinjection d'anticorps bloquants dirigés contre RAS (Ridley et al., 1995). L'analyse du phénotype indique que la dispersion est bloquée dès l'étape de réorganisation du réseau d'actine, nécessaire à l'étalement, et précédant la dissociation proprement dite.

(e) RAS est à la base d'une cascade de kinase

(i) De la membrane au noyau

La recherche en double hybride des partenaires de RAS a permis de mettre en évidence une interaction entre RAS-GTP et la MAP kinase kinase kinase RAF-1 (MAP pour mitogen-activated protein) (Van et al., 1993; Vojtek et al., 1993; Zhang et al., 1993). RAF-1 est notamment constitué en N-terminal d'un domaine CR1 (conserved region 1) riche en cystéine capable de lier RAS-GTP, et d'un domaine sérine/thréonine kinase situé en C-terminal. C'est la phosphorylation de la protéine RAF-1 sur des résidus sérines qui active son potentiel sérine/thréonine kinase, mais la kinase responsable de ces phosphorylations n'est pas connue (Morrison et al., 1993). Néanmoins, les auteurs supposent que c'est le positionnement de RAF à la membrane cytoplasmique, grâce à son interaction avec RAS, qui aurait un rôle clé dans sa phosphorylation.

RAF-1 activé interagit également avec la MAP kinase kinase MEK1, une sérine/thréonine/tyrosine kinase. RAS/RAF-1 et MEK pourraient former un complexe lorsque RAS est activé (Moodie et al., 1993; Van et al., 1993). L'activation de RAS puis de RAF permet la phosphorylation de MEK1 et 2 (Alessi et al., 1994), les potentiels catalytiques de MEK1,2 sont alors activés, la voie de signalisation poursuit son chemin.

A leur tour, les kinases MEK1,2 peuvent phosphoryler les MAP Kinases ERK1 et ERK2, des sérine/thréonine kinases, sur deux résidus thréonines et tyrosines voisins (Crews and Erikson, 1992). La phosphorylation de ERK1,2 permet l'activation de leur potentiel kinase et leur translocation dans le noyau (Lenormand et al., 1993).

En résumé, l'activation de la protéine RAS induit une cascade d'activation (RAS-RAF-MEK-ERK) qui permet la propagation du signal, tel une course de relais, de la membrane plasmique vers le noyau. Nous appellerons cette voie de signalisation la voie RAS-ERK (Figure 10).

Les MAPK ERK1,2 activées sont capables de phosphoryler de nombreux substrats, dont des cibles cytoplasmiques telles que RSK (Sturgill et al., 1988), et MNK (Waskiewicz et al., 1997), mais aussi des cibles nucléaires comprenant des facteurs de transcription. Les kinases ERK1,2 sont notamment capables de phosphoryler des facteurs de transcription appartenant à la famille ETS, tels que ETS-2, POINTED P2, ELK-1, SAP-1, SAP-2, ELF, et TEL (pour revue voir (Wasylyk et al., 1998), mais aussi d'autres facteurs de transcription, tels que FOS, MYC et CREB (pour revue voir (Treisman, 1996). La phosphorylation de ces protéines influencera positivement ou négativement leur capacité à réguler une activité transcriptionnelle.

(ii) Implication des kinases ERK dans les réponses biologiques

Il a été montré que l'activation de MET induit la phosphorylation rapide de ERK1,2 (Ponzetto et al., 1994; Ponzetto et al., 1996). qui se prolonge au delà de quatre heures (Khwaja et al., 1998; McCawley et al., 1999; Potempa and Ridley, 1998; Tanimura et al., 1998). Néanmoins, comparativement à d'autres facteurs de croissance l'HGF/SF n'induirait la translocation nucléaire que sur une faible proportion des kinases ERK1,2 (Tanimura et al., 1998).

L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de MEK1 (le PD98059) et la microinjection d'une forme inactivée de MEK1, la kinase en aval de ERK, ont permis de démontrer que l'activation des kinases ERK1-2 par MEK1 est nécessaire à la dispersion des cellules MDCK induite par l'HGF/SF. En fait, le processus est bloqué dès les étapes précoces d'étalement et de pertes des jonctions adhérentes (Khwaja et al., 1998; Potempa and Ridley, 1998).

Les kinases ERK1-2 sont capables de réguler l'activité de nombreux facteurs de transcription. On peut donc raisonnablement émettre l'hypothèse que l'activation des kinases ERK1-2 serait nécessaire à la dispersion notamment grâce à leur implication dans la régulation de l'expression des gènes. Par l'implication précoce que les kinases ERK1-2 semblent jouer sur l'étalement et les jonctions, les auteurs n'excluent pourtant pas que ERK1-2 puissent avoir des cibles cytoplasmiques (Potempa and Ridley, 1998).

De plus, toujours sur les cellules MDCK, l'inhibiteur pharmacologique de MEK1 empêche également la formation de structures branchées induites par le HGF/SF. Comme pour la

dispersion, ces résultats démontrent que l'activation des ERK est nécessaire à la morphogenèse de branchement.

La voie RAS-ERK, tout comme la protéine RAS elle-même, est nécessaire aux réponses biologiques induites par l'HGF/SF. Cependant, la protéine RAS est capable d'induire d'autres voies en aval dont les implications ont également été évaluées.

(f) Les multiples casquettes de RAS

(i) Les effecteurs de RAS

Après RAF-1, de nombreux autres partenaires de RAS ont été découverts. Il s'agit notamment de protéines apparentées à RAF-1, de la sous-unité p110 de la PI3K, de la protéine GAP^{p120}, de la protéine Ral-GDS (facteur d'échange pour les petites protéines G Ral) ou de la MAP kinase kinase MEKK1 (pour revue voir (McCormick and Wittinghofer, 1996).

Les voies de signalisation liées à ces autres partenaires de RAS restent beaucoup moins connus que la voie RAS-RAF-MEK-ERK. Pourtant, il est clair que l'interaction RAS-RAF n'est pas suffisante pour l'induction de toutes les réponses induites par RAS. En effet comme l'ont joliment démontré Joneson et ses collaborateurs, la surexpression d'une forme activée de RAS dans des fibroblastes, induit à la fois la prolifération et des modifications de morphologie ; la membrane plasmique acquiert une morphologie ridée. Une mutation ponctuelle de RAS (RAS C40) a pour conséquence d'abolir la liaison avec RAF. Ce mutant est incapable d'induire la prolifération, pourtant les modifications morphologiques sont toujours induites (Joneson et al., 1996).

Les mêmes auteurs vont plus loin, en montrant qu'une forme inactivée d'une autre petite protéine G, la protéine RAC, abolit les modifications morphologiques induites par la forme activée de RAS (Joneson et al., 1996). Bien que les mécanismes d'activation de RAC par RAS ne soient pas clairs, il semble que l'activation de RAC et de RAF soient indispensables pour l'obtention de toutes les réponses induites par RAS. Par ailleurs, RAC est connu pour être impliqué dans l'organisation du réseau d'actine. Initialement il a été montré qu'une forme activée de RAC est capable d'induire la formation de lamellipodes sur des fibroblastes. De plus, une forme inactivée de la protéine inhibe ce phénotype lorsque par exemple il est induit par le PDGF (Ridley et al., 1992).

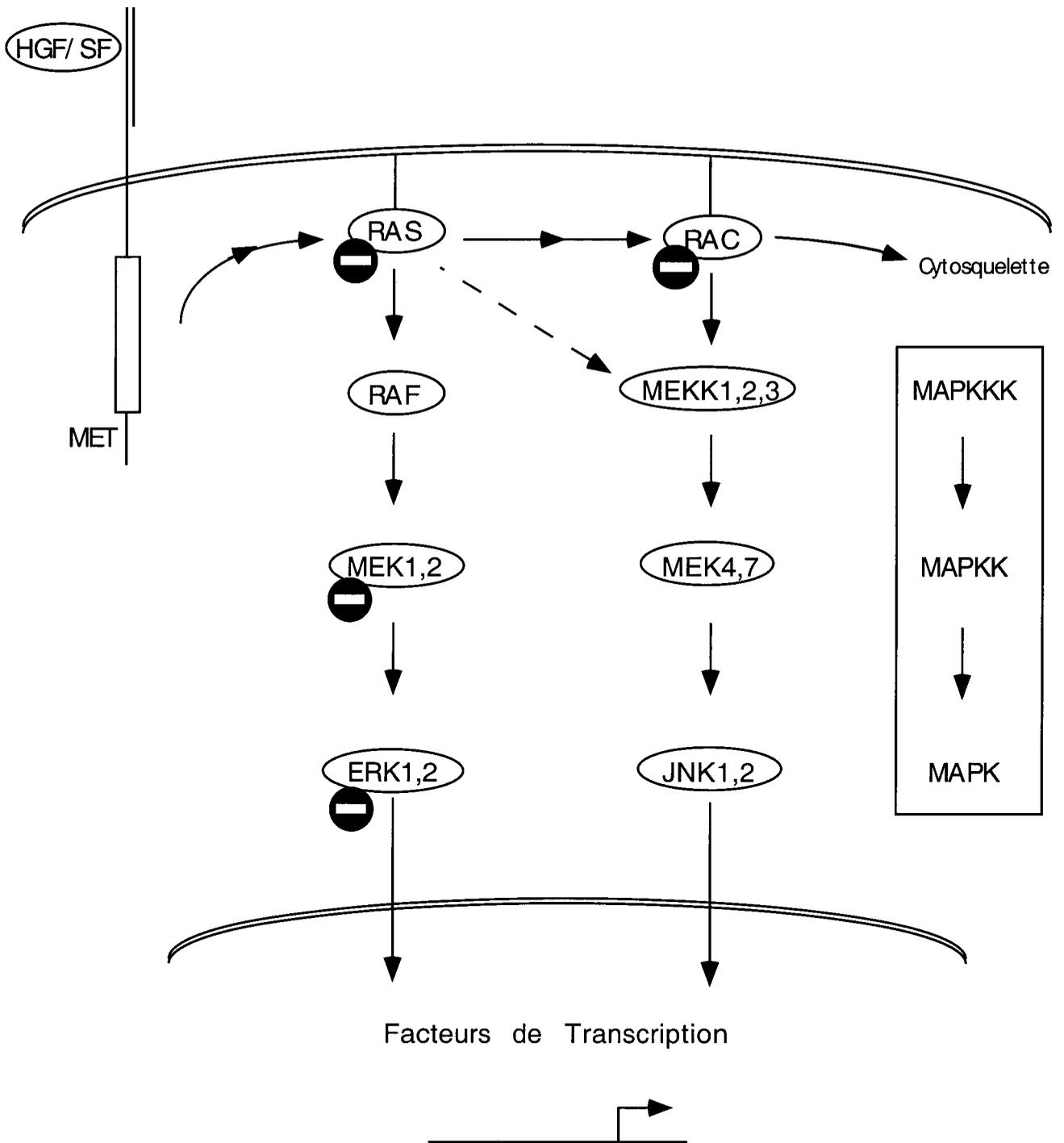


Figure 10: Représentation hypothétique des voies de signalisation en aval de RAS et de leur implication dans la dispersion des cellules MDCK induite par l'HGF/SF.

Le symbole ⊖ indique que la dispersion est abolie suite à l'inhibition des voies de signalisation en aval de la protéine. Les modules de kinases sont indiqués à gauche.

(ii) Implication de RAC dans les réponses biologiques

La micro-injection de la forme inactivée de RAC (RAC N17 incapable de lier le GTP) dans les cellules MDCK a été réalisée en parallèle à la micro-injection de RAS (Potempa and Ridley, 1998; Ridley et al., 1995). En premier lieu, les résultats démontrent que RAC est nécessaire à la réorganisation du réseau d'actine induit par l'HGF/SF. D'autre part, l'étalement induit par une forme activée de RAS est également inhibé par RAC N17, démontrant ainsi que RAC joue son rôle en aval de RAS.

Ces résultats, mis en relation avec les capacités de la protéine RAC à réguler l'organisation du réseau d'actine, permettent aux auteurs de proposer un modèle dans lequel RAS conduit à l'activation de RAC, qui régulerait l'organisation du réseau d'actine et l'étalement. D'autre part, RAS induirait l'activation des kinases ERK qui, par leur potentialité à réguler l'activité de facteurs de transcription, favoriseraient la transcription de gènes et la néo-synthèses de protéines, qui seraient également nécessaires à la dispersion (Figure 10).

(iii) RAC est à la base d'une cascade de kinase proche de la cascade RAS

Outre son rôle dans la réorganisation du cytosquelette, la petite protéine G RAC est également capable d'activer une cascade de kinases, dont l'organisation séquentielle est très proche de la cascade $RAF \rightarrow MEK \rightarrow ERK$. Il s'agit de la cascade $MEKK \rightarrow MEK_{4,7} \rightarrow JNK_{1,2}$, la MAP kinase JNK étant capable de phosphoryler le facteur de transcription JUN (Figure 10). Initialement, il a été montré que les kinases JNK sont activées par des stress variés (radiation, uv, choc osmotique, cytokines inflammatoire, etc.) (Dérijard et al., 1994). Bien que le niveau d'activation est moins important que suite à des stimulations par les stress, les facteurs de croissance tels que l'EGF ou le NGF sont également capables de les activer. De plus, il a été montré que l'induction de JNK par le NGF ou l'EGF est inhibée par une forme inactivée de RAS, suggérant que la protéine RAS est nécessaire à l'activation de la cascade JNK (Minden et al., 1994). Néanmoins les étapes suivantes ne sont pas totalement élucidées.

L'HGF/SF semble lui aussi capable d'activer cette cascade, puisqu'il induit l'activation de la kinase JNK (McCawley et al., 1999; Rodrigues et al., 1997). TPR-MET, la forme oncogénique

de MET apporte quelques informations sur les mécanismes d'activation de la cascade JNK. En effet, une forme inactivée de RAC inhibe l'activation de JNK et la transformation induite par TPR-MET (Rodrigues et al., 1997). En revanche, l'implication de la cascade JNK, lors de la dispersion ou la morphogenèse, n'est pas connue.

(g) RAS est-il suffisant pour induire la dispersion ou la morphogenèse ?

La protéine RAS est capable d'induire l'activation de nombreuses voies de signalisation qui sont nécessaires à la dispersion et la morphogenèse des cellules épithéliales induites par l'HGF/SF. Pour autant, on peut se demander si RAS a les capacités suffisantes pour induire seule ces réponses biologiques.

Les résultats expérimentaux sur ce sujet semblent contradictoires. Les expériences les plus anciennes montrent que des cellules MDCK transformées par le virus murin du sarcome de Harvey, exprimant une forme activée de RAS, acquière un phénotype dissocié dit « fibroblastoïde » (Behrens et al., 1989). Dans cette expérience, l'expression de RAS activée est constitutive, ce qui ne permet pas d'étudier l'influence de son activation alors que les cellules sont encore associées. Dans ces conditions, on peut penser que c'est plutôt l'incapacité des cellules à s'associer qui est mise en évidence.

Des expériences plus récentes, utilisant la technique de microinjection, permettent d'étudier l'influence de la surexpression d'une forme activée de RAS (RAS V12, liant de façon constitutive le GTP), alors que les cellules sont encore en îlots. Ces conditions expérimentales semblent plus proches de la dispersion induite par l'HGF/SF. Les résultats démontrent que la microinjection de RASV12 induit l'étape précoce d'étalement des îlots, mais que les cellules restent jointives. En fait, RAS V12 induit la perte des jonctions adhérentes assurées notamment par le complexe E-cadhérine/ β -caténine. En revanche, les jonctions serrées et les jonctions adhérentes assurées par les desmosomes ne sont pas altérées. Les auteurs concluent que RAS activé n'est pas suffisant, à lui seul, pour induire le phénotype complet de dispersion. Il existerait donc d'autres voies de signalisation qui coopéreraient avec RAS pour induire la dispersion.

Ainsi, les techniques de surexpression constitutives ne semblent pas adaptées pour étudier l'influence d'une forme activée sur les effets biologiques. Elles présentent pourtant l'avantage de permettre l'étude des voies en aval. Par exemple, alors que pour la morphogenèse, l'expression

inductible d'une forme activée de RAS, n'a pas été réalisé, sa surexpression constitutive apporte tout de même des informations intéressantes. En effet, la surexpression d'une forme activée de RAS ou de RAF induit une croissance désorganisée des cellules en gel de collagène, qui ne permet pas la formation de structures branchées. De façon surprenante, la reconstitution du phénomène de morphogenèse n'a pu être obtenue qu'en surexprimant une forme activée de RAS, tout en inhibant de façon modérée l'activation de la voie RAS-ERK par de faibles concentrations d'inhibiteur de MEK1, alors que de fortes concentrations d'inhibiteur bloquent la morphogenèse (Khwaja et al., 1998). Ces résultats suggèrent que l'activation de la voie RAS-ERK est nécessaire pour la morphogenèse, mais à un niveau d'activation modérée.

2) SHC

(a) SHC est une protéine adaptatrice capable de recruter GRB2

SHC (pour « SH2-containing sequence ») a été clonée en 1992 par G. Pelicci et ses collaborateurs, grâce au criblage d'une banque d'ADNc humain avec une sonde représentative du domaine SH2 de c-FEC (Pelicci et al., 1992). L'ADNc isolé code deux protéines de 52 et 46 kDa, qui proviennent de sites d'initiation de traduction distincts. Les deux isoformes présentent trois domaines; un domaine SH2 situé en C-terminal, un domaine central CH1 (pour « collagen-homology domaine 1 ») riche en résidus proline et glycine, et en N-terminal un domaine capable, comme le domaine SH2, de reconnaître des résidus tyrosines phosphorylés (domaine baptisé PTB pour « phosphotyrosine-binding domain »). Une troisième isoforme de 66 kDa, issue d'un épissage alternatif, possède en N-terminal un domaine supplémentaire (Migliaccio et al., 1997). Les trois isoformes de SHC sont capables, via leur domaine SH2 et/ou PTB, de se fixer aux résidus tyrosines phosphorylés de nombreux récepteurs tyrosines kinases tels que le récepteur à l'EGF, au NGF ou au PDGF (pour revue voir (Bonfini et al., 1996).

L'activation de ces récepteurs tyrosines kinases corrèle avec la phosphorylation de SHC sur des résidus tyrosines. La phosphorylation majeure se situe sur le résidu Y³¹⁷VNV du domaine CH1. Le résidu tyrosine phosphorylé permet à son tour la liaison au domaine SH2 de GRB2 (Salcini et al., 1994). Le complexe SHC-GRB2-SOS ainsi formé, permet *in vitro*, l'activation de RAS (Pronk et al., 1994). SHC serait donc un adaptateur capable de former un pont entre les récepteurs tyrosines kinases et le complexe GRB2-SOS.

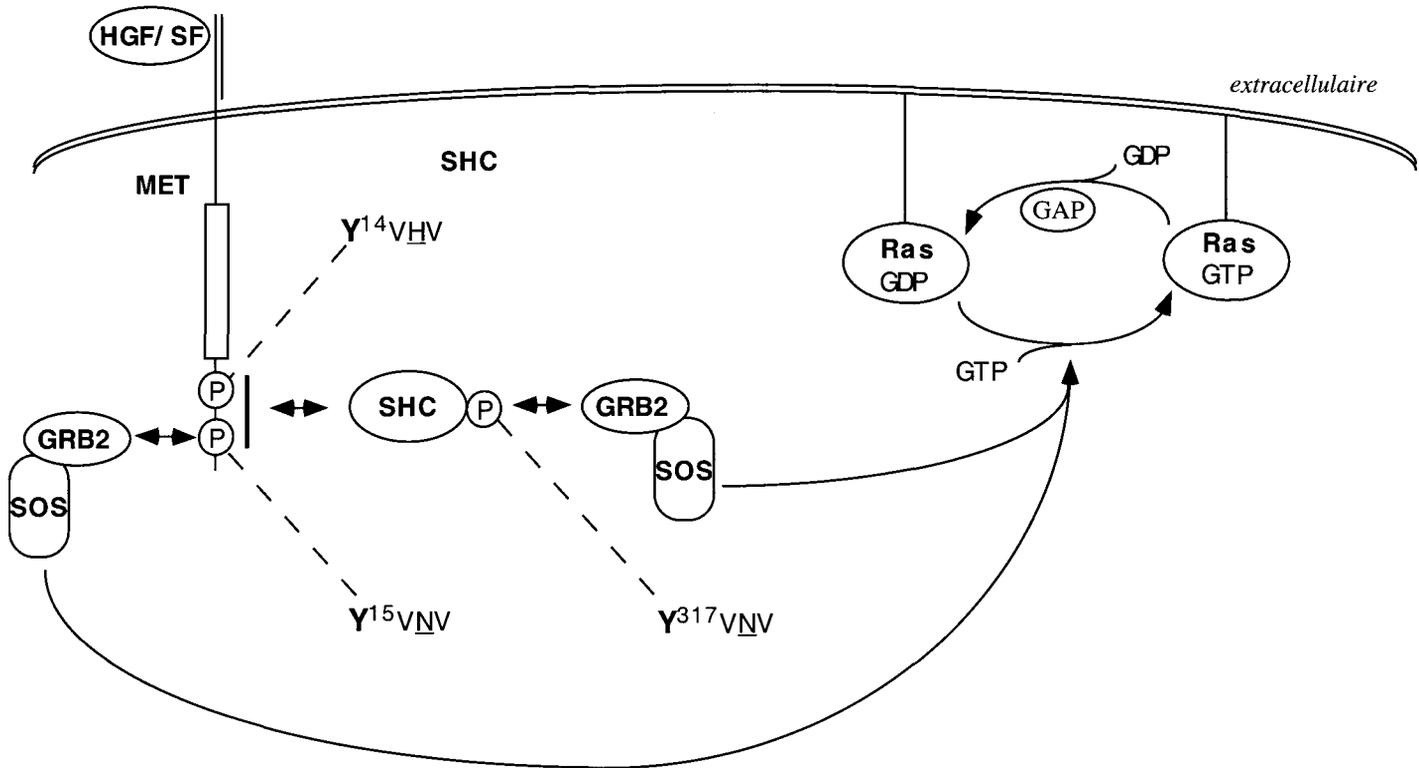


Figure 11: Recrutement du complexe GRB2/SOS par MET, directement ou indirectement par SHC.

Trois ans après avoir mis à jour SHC, G. Pelicci et ses collaborateurs montrent que la stimulation par l'HGF/SF, de cellules épithéliales issues d'un carcinome, induit sa phosphorylation. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation démontrent que le récepteur MET interagit avec SHC via les deux tyrosines du site multisubstrat (Pelicci et al., 1995). Ainsi, MET est capable de recruter le complexe GRB2-SOS, soit directement par le résidu tyrosine15, soit indirectement via SHC (Figure 11).

(b) Implication de SHC dans les réponses biologiques

Bien que la fonction de SHC semble redondante, son implication dans les réponses biologiques induites par MET n'en est pas moins importante. En effet, la surexpression d'une protéine SHC inactive, mutée sur le résidu tyrosine 317, réduit la motilité induite par L'HGF/SF sur des cellules humaines d'adénocarcinome, alors que la forme sauvage la potentialise (Pelicci et al., 1995).

3) PI3K

(a) Recrutement de la PI3K par le site multisubstrat

La première protéine découverte, interagissant avec les tyrosines 14 et 15 de MET, fut la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Ponzetto et al., 1993). La PI3K est formée de deux sous-unités p85 et p110. La p85 est constituée de deux domaines SH2, d'un domaine SH3 et d'un domaine iSH2 (inter-SH2), qui permet l'association avec p110 qui porte l'activité Kinase. C'est l'association p85/p110 qui induit l'activation catalytique de la PI3K. La p85 interagit, via ses domaines SH2, avec les tyrosines phosphorylées de nombreux récepteurs tyrosines kinases. Les domaines SH2 de la p85 reconnaissent notamment les tyrosines phosphorylées suivies d'une séquence consensus YXXM. La découverte de l'interaction de la p85 avec MET permet de définir un motif original reconnu par les domaines SH2 de la p85, puisque les tyrosines 14 et 15 de MET sont suivies d'une séquence YVXV (Ponzetto et al., 1993).

La PI3K activée est capable de phosphoryler les phosphatidylinositides (PtdIns) en position 3 de leur cycle aromatique, permettant, selon l'état de phosphorylation des PtdIns, la formation de PtdIns 3-P, PtdIns 3,4-P₂ ou PtdIns 3,4,5-P₃. Les effecteurs de la PI3-K ne sont pas clairement

définies. Cependant, l'activité de la PI3-K semble nécessaire pour l'activation d'autres protéines telles que AKT ou la S6 kinase ^{pp70} (Vanhaesebroeck et al., 1997). D'autre part, RAS-GTP est capable de s'associer à la p110, suggérant que la PI3K est un effecteur de RAS (Rodriguez-Viciano et al., 1994).

(b) Implication de la PI3K dans la dispersion et la morphogénèse; Dialogue PI3K/RAS

Les inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K, tels que la wortmannine et le LY294002, ont permis une véritable explosion sur la connaissance des implications de cette protéine dans les réponses biologiques. L'HGF/SF a également largement bénéficié de l'efficacité de ces inhibiteurs et les résultats obtenus ont été déterminants. En effet, l'utilisation de ces inhibiteurs a montré que l'activité de la PI3K est requise à la fois pour la dispersion (dès l'étape d'étalement) et à la morphogénèse de branchement (Khwaja et al., 1998; Royal and Park, 1995).

D'autre part, les inhibiteurs de la PI3K réversent le phénotype dissocié induit par la surexpression constitutive d'une forme activée de RAS (Khwaja et al., 1998), démontrant que la PI3K est nécessaire aux effets induits par RAS.

(c) Les cibles de la PI3K

L'HGF/SF, via la PI3K, est capable d'activer notamment les kinases AKT et S6 kinase ^{pp70}. Bien que la rapamycine, un composé pharmacologique, soit capable d'inhiber l'activité de la S6 kinase ^{pp70}, ce composé est incapable d'inhiber la dispersion induite par l'HGF/SF (Royal and Park, 1995). D'autre part, la surexpression de AKT ne permet pas de mimer les effets induits par la PI3K (Khwaja et al., 1998). Ainsi, ces deux cibles de la PI3K ne semblent pas impliquées dans les effets induits par l'HGF/SF sur les cellules MDCK.

Le PDGF est capable d'induire la formation de lamellipodes sur de nombreux types cellulaires. De façon intéressante, il a été montré que c'est l'activation de la PI3K par le PDGF qui est responsable de l'activation en relais de RAC, qui sera alors capable de réorganiser le réseau d'actine. (Hawkins et al., 1995). Bien que cette relation n'ait pas encore été établie dans le cas de l'HGF/SF, il est attractif d'imaginer que la PI3K activée par l'HGF/SF puisse activer RAC.

(d) RAS, PI3K et morphogenèse

Pour la morphogenèse de branchement, les résultats obtenus par Khwaja et ses collaborateurs permettent de préciser un peu plus les mécanismes. Comme nous l'avons vu, la surexpression d'une forme activée de RAS n'induit la formation de structure branchée que si la voie RAS-ERK est légèrement inhibée. La formation de branchement a également été obtenue par la surexpression de forme activée de RAS, dont une mutation ponctuelle (RAS C40) inhibe l'activation de la voie RAS-ERK. En revanche, un mutant de RAS incapable d'activer la PI3K (RAS G37) perd toutes ses capacités. Ainsi, la morphogenèse induite par RAS serait directement liée à ses capacités d'activation de la PI3K (Khwaja et al., 1998).

En résumé, la PI3K peut être activée soit par le recrutement à la membrane via MET soit suite à l'activation de RAS. La PI3K et RAS sont tous deux indispensables pour la dispersion et la morphogenèse induites par l'HGF/SF. Pour la morphogenèse de branchement, le niveau d'activation des voies jouerait un rôle capital; activation forte pour la PI3K et activation modérée pour la voie RAS-ERK.

4) SRC

(a) Recrutement de SRC est par le site multisubstrat

La protéine SRC a été identifiée initialement grâce au virus oncogénique du sarcome de Rous, qui permet l'expression d'une forme transformante de la protéine (Stehelin et al., 1976). La protéine SRC est constituée d'un domaine SH2, SH3 et SH4 (SH pour SRC homology domain) et d'un domaine portant une activité tyrosine kinase. Le domaine SH2 permet à SRC de reconnaître les tyrosines phosphorylées de nombreux récepteurs tyrosines kinases. Sur le récepteur MET, le domaine SH2 de SRC reconnaît les tyrosines phosphorylées 14 et 15 du site de liaison multisubstrat (Ponzetto et al., 1994).

Après stimulation par des facteurs de croissance, SRC est capable de phosphoryler de nombreux substrats sur des résidus tyrosines. La kinase a notamment pour cible de nombreuses

protéines du cytosquelette telles que la « focal adhesion kinase » (FAK), l'Ezrine ou la β Catenine ou d'autres enzymes telles que la PI3K ou SHP-2 (pour revue voir (Thomas and Brugge, 1997).

(b) SRC et l'HGF/SF dispersent les cellules MDCK par des mécanismes différents

Dès 1989, Behrens et ses collaborateurs montrent que le virus de Moloney, exprimant une forme activée de SRC, induit un phénotype dissocié sur les cellules MDCK (Behrens et al., 1989). Plus tard, un système d'expression inductible de la protéine, toujours dans les cellules MDCK, précise le résultat ; l'expression induite d'une forme activée de SRC provoque la dispersion des cellules organisées en îlot en moins d'une heure (Behrens et al., 1993). Ainsi, de façon surprenante et contrairement à RAS ou la PI3K, il semble que SRC soit capable à lui seul d'induire la dispersion à partir de cellules épithéliales organisées en îlot. Néanmoins, à l'inverse de la dispersion induite par l'HGF/SF, celle induite par SRC ne semble pas être dépendante de la néo-synthèse de protéines. En effet, le processus ne nécessite pas plus d'une heure. De plus, alors que la dispersion induite par l'HGF/SF est bloquée par un inhibiteur de la synthèse protéique, la dispersion induite par SRC ne l'est pas (Boyer et al., 1997). Les auteurs suggèrent que SRC pourrait être impliqué dans la dispersion grâce à ses capacités à induire la réorganisation du réseau d'actine et la perte des jonctions intercellulaires.

La dispersion induite par l'EGF est inhibée par la microinjection d'une forme inactivée de SRC. (Boyer et al., 1997) Bien que pour la dispersion induite par l'HGF/SF ces expériences n'ont pas été réalisées, il est probable que SRC joue également un rôle déterminant lors des processus de dispersion. D'autre part, il semble que SRC soit en aval de RAS, puisque la microinjection de la forme inactivée de SRC inhibe la dispersion induite par la surexpression constitutive d'une forme activée de RAS.

5) STAT3

(a) Protéine de signalisation et facteur de transcription

De nombreux récepteurs de cytokines, ne possèdent pas d'activité kinase intrinsèque, mais sont capables de s'associer à des protéines ayant une activité tyrosine kinase. Ces kinases

associées, baptisées JAK pour « janus kinase » ou « just another kinase », sont au nombre de quatre et comprennent TYK2 et JAK1, 2 et 3. L'oligomérisation des récepteurs induite par les cytokines permet le rapprochement des kinases JAK et l'activation de leur potentiel tyrosine kinase. Les JAK sont alors capables de phosphoryler les récepteurs sur des résidus tyrosines qui serviront de sites de recrutement. Les protéines STAT, au nombre de six, possèdent un domaine SH2 qui leur permet de se lier sur ces résidus tyrosines phosphorylés. De plus, les protéines STAT sont elles mêmes phosphorylées par les JAK. Les STAT phosphorylées peuvent alors se dimériser et sont transloquées dans le noyau où elles peuvent réguler la transcription de gènes possédant des sites de liaisons spécifiques pour ces facteurs. Les STAT pour « signal transducers and activators of transcription » tirent leur nom de leur double compétence.

Les récepteurs tyrosines kinases sont également capables de transmettre des informations via les protéines STAT. Par exemple, l'activation du récepteur à l'EGF induit la phosphorylation rapide de JAK1 et STAT 1, 3 et 5. Cependant, les mécanismes d'activation semblent différents de ceux utilisés par les récepteurs des cytokines. En effet, l'autophosphorylation des récepteurs à activité tyrosine kinase conduit à la phosphorylation de résidus tyrosines, qui permettent le recrutement des STAT sans qu'il y ait nécessité d'une intervention des kinases JAK (pour revue voir (Leaman et al., 1996).

(b) STAT3 semble être recrutée par le site multisubstrat

STAT3 est la dernière protéine identifiée appartenant aux voies de signalisation induites par le récepteur MET. En 1997, une première publication indique que, dans des hépatocytes en culture, l'HGF/SF induit la phosphorylation de la protéine STAT3 après 5 à 7 heures de traitement (Schaper et al., 1997). La cinétique d'activation est alors très éloignée de l'activation rapide des protéines STAT induite par les cytokines (de l'ordre de la minute). L'année suivante, l'équipe de P. Comoglio démontre, cette fois dans les cellules épithéliales MDCK, que l'HGF/SF induit la phosphorylation de STAT3 et sa translocation dans le noyau, après 15 minutes de traitement. De plus, l'HGF/SF induit la liaison des protéines STAT3 sur un oligonucléotide correspondant à sa séquence de reconnaissance spécifique, et induit la transactivation d'un promoteur contenant ces éléments de réponse. Enfin, STAT3 est capable de se lier au récepteur MET activé et cette liaison est inhibée par un peptide phosphorylé, mimant la tyrosine 15 et son

environnement en acides aminés, suggérant que le site de liaison multisubstrat est responsable du recrutement de STAT3 (Boccaccio et al., 1998).

(c) Spécificité d'action sur la morphogenèse de branchement

Comme nous l'avons vu, pour connaître l'implication d'une protéine lors de réponses biologiques, les auteurs cherchent à interférer avec son activité. Pour se faire, il est possible d'utiliser des formes inactivées de la protéine ou des inhibiteurs pharmacologiques. Pour interférer avec l'activité de la protéine STAT3, l'équipe de P. Comoglio a utilisé un système de peptides inhibiteurs phosphorylés. Le peptide phosphorylé GY^(P)IKTE issu de STAT3 mime le motif reconnu par le domaine SH2, qui permet la dimérisation et la translocation dans le noyau des protéines STAT3. De tels peptides permettent d'inhiber par compétition la dimérisation des protéines STAT3 et ainsi d'inhiber leur activité (Boccaccio et al., 1998).

Les cellules MDCK, électroporées en présence de tels peptides, sont incapables d'élaborer des structures branchées en gel de collagène. En revanche, la dispersion n'est pas perturbée. Par opposition, un peptide Y^(P)VNV, mimant l'environnement de la tyrosine phosphorylée 15, bloque à la fois la dispersion et la morphogenèse (Boccaccio et al., 1998). La protéine STAT3 semble donc être spécifiquement impliquée dans la morphogenèse de branchement et mérite son classement dans les effecteurs morphogènes. Cette expérience montre, pour la première fois, que l'inhibition de l'activation d'un effecteur de MET permet l'abolition de la morphogenèse, sans perturber la dispersion. Ces résultats impliquent que la dispersion et la morphogenèse nécessitent au moins en partie des voies de signalisation spécifiques.

6) GAB1

(a) Premier effecteur de MET découvert par la technique de double hybride

L'interaction GAB1/MET a été mise à jour, non plus en vérifiant l'interaction de deux protéines déjà connues, mais dans une recherche systématique des protéines associées à MET.

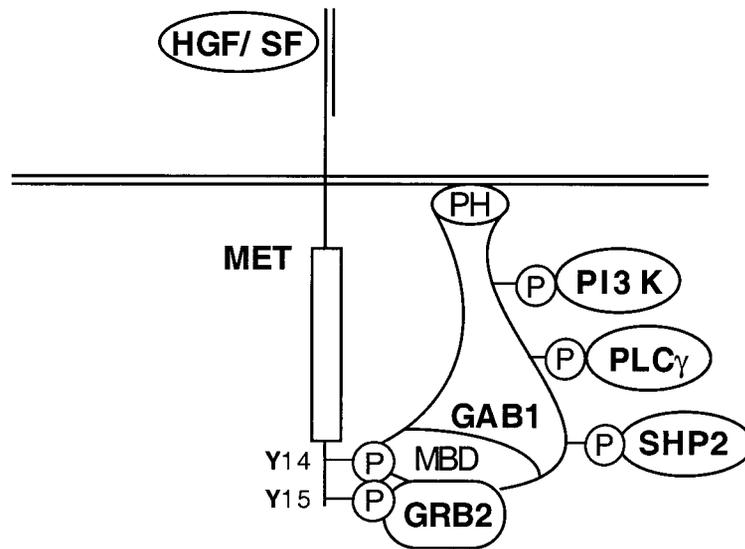


Figure 12: Interaction de l'adaptateur GAB1 avec MET et GRB2, et recrutement en relais des protéines PI3K, PLC γ et SHP2

Pour ce faire, M. Weidner et ses collaborateurs ont utilisé le système du double hybride. L'hameçon a été une protéine de fusion constituée de la partie intracellulaire du récepteur MET et de la protéine LEXA, qui permet la dimérisation des domaines intracellulaires de MET. Ceux-ci sont alors activés et peuvent par conséquent recruter des effecteurs. De façon convaincante, la recherche en double hybride a permis le clonage de l'ADNc de partenaires de MET déjà identifiés, telles que GRB2 et la PI3K. De plus l'équipe a isolé un ADNc codant une protéine d'environ 110 kDa. Cette interaction est perdue quand les tyrosines 14 et 15 de la partie C-terminale ont été mutées, suggérant une fois de plus l'implication du site multisubstrat pour le recrutement (Weidner et al., 1996).

L'ADNc isolé par M. Weidner est identique à celui découvert peu de temps avant par Holgado-Madruga et ses collaborateurs (Holgado et al., 1996). Il s'agit de l'ADNc codant la protéine GAB1 (pour « GRB2-associated binder-1 ») cloné à partir d'une banque d'expression, criblée avec une protéine GRB2. GAB1 partage de nombreuses homologues en acides aminés avec IRS1 (insuline-receptor substrat 1), une protéine adaptatrice phosphorylée suite à l'activation du récepteur à l'insuline et capable de recruter en relais des protéines à domaine SH2.

M. Weidner et ses collaborateurs ont également identifié le domaine de GAB1 responsable de l'interaction avec les tyrosines de l'extrémité C-terminale de MET. Il s'agit d'un nouveau domaine, qui comme les domaines SH2 et PTB est capable de reconnaître des motifs contenant une tyrosine phosphorylée, ce domaine a été baptisé MBD pour « MET binding domain ». GAB1 possède également un domaine PH, qui permet la localisation de la protéine à la membrane plasmique (Maroun et al., 1999; Weidner et al., 1996).

Suite à l'identification de GAB1, les équipes en orbite autour de MET ont précisé les interactions GAB1/MET et ont exploré les voies de signalisation en aval. En fait, il semble que la liaison de GAB1 sur MET soit conditionnée par une association préalable entre le domaine MBD de GAB1, contenant des régions riches en proline, et le domaine SH3 de GRB2 : la fixation du domaine SH2 de GRB2 sur la tyrosine 15 favoriserait la liaison de GAB1 sur la tyrosine supérieure 14 (Bardelli et al., 1997; Maroun et al., 1999; Nguyen et al., 1997). Suite à son recrutement par MET, GAB1 est phosphorylé sur des résidus tyrosines (Weidner et al., 1996). Trois protéines à domaine SH2 (PLC γ , PI3K et SHP2) sont capables d'interagir avec ces tyrosines phosphorylées (Bardelli et al., 1997). Il semble donc que GAB1 soit une protéine

adaptatrice capable de se lier au récepteur MET et de recruter en relais d'autres protéines de signalisation (Figure 12).

(b) Implication spécifique de GAB1 dans la morphogénèse ?

De façon à déterminer le rôle de GAB1 dans les cellules MDCK, M. Weidner et ses collaborateurs ont surexprimé une forme tronquée de la protéine constituée uniquement du domaine MBD, nécessaire à la liaison sur le récepteur MET. La surexpression du domaine MBD, dans les cellules MDCK, bloque totalement le processus de morphogénèse et inhibe fortement la dispersion induite par l'HGF/SF, démontrant le rôle crucial joué par GAB1. De plus, la protéine entière induit un phénotype dissocié et la morphogénèse de branchement, ce qui n'était a priori pas attendu pour une protéine adaptatrice dont l'activité est dépendante des phosphorylations induites par des kinases en aval (Weidner et al., 1996).

Cependant, ces résultats n'ont pas été reproduits par l'équipe de M. Park, qui montre que la surexpression de GAB1, dans les cellules MDCK, ne modifie pas les phénotypes (Maroun et al., 1999). A défaut d'explication plus claire, les auteurs attribuent cette contradiction importante, à la différence de sensibilité possible entre les lignées de cellules MDCK et/ou la difficulté à quantifier efficacement les phénotypes.

Quoi qu'il en soit, l'absence de phénotype suite à la surexpression de GAB1 a conduit l'équipe de M. Park à aller plus loin. L'utilisation de chimères CSFR-MET avait permis de montrer que la mutation du résidu tyrosine 15, ou la mutation du résidu aspartique situé deux acides aminés plus loin (induisant la perte spécifique du recrutement de GRB2) ne permettait plus la morphogénèse de branchement, alors que la dispersion était conservée (Fournier et al., 1996). Or, dans des cellules MDCK surexprimant GAB1, ces chimères CSFR-MET sont de nouveau capables d'induire la morphogénèse de branchement (Maroun et al., 1999). En fait, lorsque GRB2 ne peut plus se lier au récepteur, GAB1 n'interagit avec MET que via la tyrosine 14, ce qui a pour conséquence de diminuer fortement son interaction avec MET (Nguyen et al., 1997). Les auteurs proposent que dans ces conditions, l'activation de GAB1 n'est plus suffisante pour induire la morphogénèse. En fait, la surexpression de GAB1 forcerait son interaction avec la tyrosine 14 ; la quantité de protéine GAB1 activée serait alors de nouveau suffisante pour permettre la morphogénèse.

Il semble donc que GAB1 soit nécessaire pour la morphogenèse de branchement induit par l'HGF/SF. Pour autant, peut-on classer GAB1 parmi les « facteurs morphogènes » au même titre que STAT3 ? Tout d'abord, il semble que GAB1 ne soit pas spécifiquement impliqué dans la morphogenèse, puisque la surexpression du domaine MBD a des conséquences à la fois sur la dispersion et la morphogenèse. De plus, GAB1 est un adaptateur capable de recruter des protéines, comme la PI3K, dont l'implication dans la dispersion et la morphogenèse est déjà avérée. Il semble donc plus prudent de considérer que GAB1 favorise, de manière générale, l'activation des voies de signalisation en aval de MET.

GAB1 ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque, ces capacités sont dues à ses fonctions d'adaptateur. Ce fait souligne, comme pour SHC, l'importance d'une telle fonction pour l'induction correcte des voies de signalisation. Dans le cas particulier du récepteur MET, le rôle de ces adaptateurs pourrait être encore plus important. En effet, le récepteur MET recrute de nombreux effecteurs sur une région très restreinte. La mise en jeu d'adaptateurs, capables à eux seuls de lier sur différentes tyrosines de multiples protéines (PI3K, SHP2, PLC γ), pourrait alors être essentielle pour une activation efficace de l'ensemble des voies de signalisation.

7) Les autres partenaires de MET

(a) L'implication de la PLC γ , de SHP-2, ou de NCK n'est pas élucidée

Pour certains partenaires de MET, la perturbation de leur activité n'a pas modifié les réponses biologiques observées. C'est le cas pour la PLC γ qui est recrutée par les résidus tyrosines de la partie C-terminale de MET et par GAB1. Le U-73122, un composé pharmacologique, capable d'interférer avec l'activité de la PLC γ , est incapable d'inhiber la dispersion des cellules MDCK induite par l'HGF/SF (Royal and Park, 1995). Pour autant, il serait imprudent de conclure que la PLC γ ne joue aucun rôle. En effet, il serait par exemple intéressant d'utiliser le même inhibiteur lors de la morphogenèse de branchement.

Pour d'autres effecteurs, leur rôle dans les réponses biologiques n'a tout simplement pas encore été publié. Il s'agit notamment de la phosphatase SHP-2 ou encore de la protéine NCK, une protéine apparentée à GRB2 dont l'interaction avec MET n'a été relatée qu'une fois (Kochhar and Iyer, 1996).

(b) BAG1 et PTP-S ne sont pas recrutés par le site multisubstrat

(i) La protéine BAG1 et la protection de l'apoptose

Tout comme GAB1 (attention ne pas confondre GAB1 et BAG1), l'interaction MET-BAG1 a été mise à jour par une recherche systématique des protéines associées à MET. La liaison MET-BAG1 a été révélée par l'hybridation d'une protéine recombinante marquée, constituée de la région intracellulaire de MET, sur une banque d'expression issue d'un embryon de souris (Bardelli et al., 1996).

En fait, BAG1 a été également cloné un an plus tôt par une autre équipe, grâce à son interaction avec la protéine BCL2 (Takayama et al., 1995). De plus, il a été initialement montré que BAG1 coopère avec BCL2 pour protéger de l'apoptose. Cependant, les mécanismes permettant cette protection par BAG1 ne sont pas encore définis.

C'est une région située en C-terminale de BAG1 qui est responsable de la liaison sur MET. En revanche, les sites de la partie intracellulaire de MET, nécessaires à l'interaction, ne sont pas connus. Cependant, il a été établi que la phosphorylation de MET n'est pas requise pour la fixation et que ni la région contenant les résidus tyrosines phosphorylés 8 et 9, ni celle contenant les tyrosines 14 et 15 ne sont capables d'interagir avec BAG1 *in vitro*. Néanmoins, l'interaction MET-BAG1 est modulable puisque le processus d'apoptose favorise la liaison de BAG1 sur le récepteur (Bardelli et al., 1996).

Sur les cellules MLP-29 (des cellules embryonnaires de foie), l'HGF/SF protège de l'apoptose induite notamment par la staurosporine. Dans ces cellules, la surexpression de BAG1 permet d'augmenter la protection de l'apoptose induite par l'HGF/SF, suggérant que les propriétés anti-apoptotiques de MET sont liées à cette protéine (Bardelli et al., 1996).

(ii) La phosphatase PTP-S

Dès 1993, il était établi que l'activation de MET corrélait avec l'activation d'une phosphatase, qui semblait associée au récepteur (Villa-Moruzzi et al., 1993). A l'époque, ni l'identité, ni la localisation du site de fixation de la phosphatase sur MET n'étaient connus. Quelques interrogations ont récemment été levées.

En effet, il a été montré que l'activité phosphatase associée à MET est dépendante d'une quinzaine d'acides aminés (995-1009), situés dans la partie juxtamembranaire. De plus, des tests *in vitro*, démontrent qu'un peptide de synthèse reproduisant la séquence autour du résidu tyrosine 2 (position 1003) inhibe fortement l'activité phosphatase associée au récepteur. Par la même approche, il a également été démontré que l'activité phosphatase associée à MET ne requière pas la présence de la tyrosine 2, alors que les résidus flanquants sont nécessaires (Villa-Moruzzi et al., 1998).

Ensuite, par des purifications biochimiques, les auteurs ont repéré des fractions protéiques ayant une activité phosphatase. Les protéines d'une des fractions ont été reconnues par un anticorps dirigé contre la phosphatase PTP-S (Villa-Moruzzi et al., 1998). Ainsi, il semble que le récepteur MET soit capable de lier la phosphatase PTP-S, par quelques acides aminés situés entre la position 999 et 1007.

Jusqu'à présent, aucun résultat ne fait état du rôle joué par cette phosphatase dans la signalisation de MET. Pourtant ces résultats nous en rappellent d'autres. En effet, M. Weidner et ses collaborateurs ont montré que la mutation du résidu tyrosine 2, ou des résidus entourant la tyrosine, provoque l'acquisition d'un phénotype dissocié sur les cellules MDCK (Weidner et al., 1995). Les auteurs ont proposé, que la tyrosine et la séquence l'entourant pourraient lier une protéine capable de réguler négativement la signalisation en aval de MET. Ainsi, l'absence de fixation de cette protéine aurait pour conséquence d'activer les voies en aval de MET, ce qui provoquerait l'obtention du phénotype dissocié. Il est tentant d'imaginer que cette protéine hypothétique soit PTP-S. Pourtant il faut rester prudent, ne serait-ce que parce que PTP-S ne semble pas avoir besoin de la tyrosine 2 pour se lier au récepteur, alors que le phénotype dissocié est obtenu avec la mutation de ce résidu.

Conclusion

L'HGF/SF est un facteur de croissance d'origine mésenchymateuse dont le récepteur spécifique, le récepteur tyrosine kinase MET, est présent majoritairement sur les cellules d'origine épithéliale. L'HGF/SF et MET sont nécessaires à la mise en place de structures épithéliales durant le développement et sont impliqués dans la régulation l'homéostasie de tissus épithéliaux chez l'adulte.

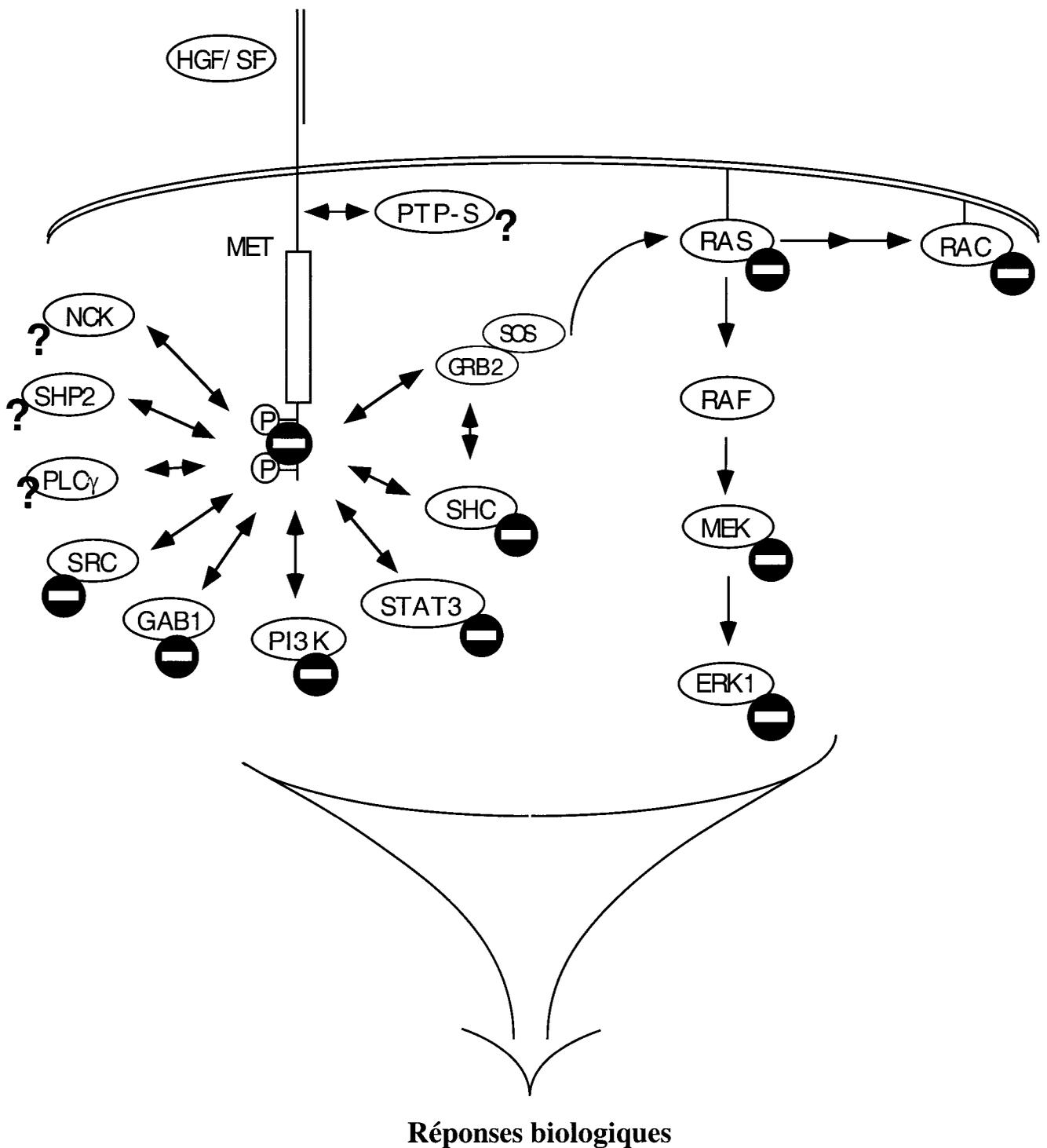


Figure 13: Effecteurs de MET nécessaires à la transduction du signal
 Le symbole **⊖** indique que la dispersion et/ou la morphogenèse sont perturbées par l'inhibition des voies en aval de la protéine. Le point d'interrogation indique que l'implication reste à découvrir.

Le récepteur MET, activé par l'HGF/SF, est à l'origine de l'activation de voies de signalisation intracellulaires. C'est l'intégration par la cellule des informations médiées par ces voies de signalisation qui permettra les réponses biologiques. Certaines étapes sont nécessaires au cheminement de l'information. Il s'agit d'abord du récepteur MET lui-même, dont l'activité tyrosine kinase et les résidus tyrosines 14 et 15, responsables du recrutement de nombreuses protéines cytoplasmiques, jouent un rôle crucial pour l'obtention des réponses biologiques. De nombreuses protéines, impliquées très tôt dans la transmission de l'information, sont également nécessaires. Il s'agit des adaptateurs SHC et GAB1, il s'agit encore des protéines RAS, PI3K, SRC ou STAT3 (Figure 13).

Résultats et Discussion

RESULTATS

Première partie : Mise en place d'un modèle de signalisation pour l'activation transcriptionnelle d'éléments de réponse à RAS, par l'HGF/SF

I. Introduction

Le laboratoire a largement contribué à la description du patron d'expression de ETS1, notamment durant l'angiogenèse et lors des interactions épithélium/mésenchyme, au cours du développement ou lors de processus pathologiques. De manière générale, ces résultats ont montré que la plupart des tissus épithéliaux n'expriment pas ETS1, alors que les mésenchymes adjacents l'expriment. Cependant, une expression de ETS1 est détectée dans les cellules épithéliales quand elles subissent des transitions épithélium/mésenchyme.

En effet, alors que les transcrits de ETS1 ne sont pas détectés dans les structures épithéliales cohésives, leur expression est induite lorsque les structures se dissocient et que les cellules d'origines épithéliales migrent. Deux exemples caractéristiques illustrent l'induction de l'expression du facteur de transcription ETS1 au cours des processus de transitions épithélium/mésenchyme: (i) lorsque la partie ventrale des somites se dissocie pour former le sclérotome; (ii) lorsque des cellules de la crête neurale, issues du tube neural, se dissocient et migrent pour participer à la mise en place de nouvelles structures.

Sur les cellules épithéliales MDCK, l'HGF/SF est capable d'induire la dispersion des cellules organisées en îlot ; les cellules acquièrent un phénotype de cellules mésenchymateuses. Cette dispersion obtenue *in vitro*, se rapproche des transitions épithélium/mésenchyme observées durant le développement. Ainsi, il semblait intéressant de décrire, sur ce modèle cellulaire, l'expression de ETS1 durant ce processus. En fait, les transcrits de ETS1 ont été détectés dans les cellules MDCK en cours de dispersions induites par l'HGF/SF. De plus, l'expression de ETS1 corrèle avec l'expression de l'uPA et de la collagénase 1, dont les promoteurs contiennent des sites EBS fonctionnels, suggérant une implication du facteur de transcription dans la régulation de l'expression de ces gènes. Ces résultats sont présentés dans la première partie de la première publication.

Lors de mon arrivée dans le laboratoire, nous avons cherché à évaluer, dans les cellules MDCK stimulées par l'HGF/SF, l'implication fonctionnelle de ETS1, notamment dans la régulation de l'expression de gènes de protéases. Pour obtenir ces données, nous avons transfecté transitoirement dans les cellules MDCK, des gènes indicateurs sous le contrôle de promoteurs contenant des sites EBS (notamment les promoteurs de l'uPA et de la collagénase 1) et des formes inactivées de ETS1, mais aussi des formes inactivées ou activées d'autres protéines, pouvant appartenir à la signalisation de l'HGF/SF. Les résultats engendrés par ce travail ont permis de mettre en place un modèle de signalisation pour l'activation transcriptionnelle d'éléments de réponse à RAS par l'HGF/SF, et ont logiquement pris place dans la deuxième partie de la première publication.

II. Publication 1

Titre : The Ets1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter factor-stimulated MDCK epithelial cells.

The ETS1 Transcription Factor Is Expressed during Epithelial-Mesenchymal Transitions in the Chick Embryo and Is Activated in Scatter Factor-stimulated MDCK Epithelial Cells¹

Véronique Fafeur,² David Tulasne, Christophe Quéva,³ Chantal Vercamer, Valérie Dimster, Virginie Mattot, Dominique Stéhelin, Xavier Desbiens, and Bernard Vandembunder

Centre National de la Recherche Scientifique, EP 560 [V. F., D. T., C. Q., C. V., V. M., B. V.] and UMR 319 [D. S.], Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille, B.P.447, 59021 Lille, and Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Développement, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq 59655 [V. D., X. D.], France

Abstract

In embryos and in human tumors, the expression of the ETS1 transcription factor correlates with the occurrence of invasive processes. Although this was demonstrated in cells of mesodermal origin, the expression of ETS1 was not detected in epithelial cells. In the present study, we show that during early organogenesis in the chick embryo, ETS1 mRNA expression was transiently induced in epithelial structures, during emigration of neural crest cells and dispersion of somites into the mesenchymal sclerotome. In contrast, the expression of ETS1 was not detected in situations where epithelial layers stayed cohesive while forming a new structure, such as the dermomyotome forming the myotome. The involvement of ETS1 in epithelial cell dissociation was examined in MDCK epithelial cells stimulated by scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF), a potent inducer of cell dissociation and motility. SF/HGF was found to stimulate ETS1 mRNA and protein expressions, and these increases coincided with the dispersion of cells and the expression of protease mRNAs, such as urokinase-type plasminogen activator and collagenase, but not with the protease inhibitor, plasminogen activator inhibitor type 1. Furthermore, we showed that SF/HGF was able to induce a transcriptional response involving ETS1 by using artificial as well as cellular promoters, such as the

urokinase-type plasminogen activator and collagenase 1 promoters, containing RAS-responsive elements with essential ETS-binding sites. These data demonstrate expression of ETS1 during epithelial-mesenchymal transitions in the developing embryo and show that ETS1 can act as a downstream effector of SF/HGF in MDCK epithelial cells. Taken together, these data identify ETS1 as a molecular actor of epithelial cell dissociation.

Introduction

The proto-oncogene *ETS1* is the cellular progenitor of *v-ETS* and the founder member of a new family of transcription factors, sharing a DNA-binding domain of ~83 amino acids called the ETS domain, which recognizes specific nucleotides sequences with a GGAA/T core sequence. During the past few years, extensive investigations have led to a better knowledge of the molecular structures and properties of the ETS1 proteins, but their biological roles and the mechanisms of their induction are still poorly understood (reviewed in Refs. 1 and 2).

Analysis of *ETS1* expression in developing embryos revealed a broad pattern of expression (3-7), which suggests that this gene may serve multiple functions during developmental processes. In chicken and mouse embryos, *ETS1* mRNAs were detected in various mesodermal derivatives, such as endothelial cells and mesenchymal cells. *ETS1* is expressed in endothelial cells of newly forming blood vessels during angiogenesis (3) and in mesenchymal cells in the vicinity of epithelia when epithelial-mesenchymal interactions occur, such as during branching morphogenesis in the kidney and in the lung, or during outgrowth of the limb bud (3-6). A similar pattern of *ETS1* expression was also observed during the stromal reaction in human tumors, where *ETS1* mRNAs accumulate in endothelial cells and in fibroblasts surrounding invasive carcinomas of various origins, but not in more distant fibroblasts and in epithelial tumor cells (8, 9). These results revealed that *ETS1* was expressed in mesodermal derivatives during dynamic cellular processes involving cell dissociation and migration and extracellular matrix remodeling.

SF,⁴ a soluble mesenchymal factor, was identified on the basis of its ability to dissociate normal and malignant epi-

Received 8/20/96; revised 3/13/97; accepted 3/24/97.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by the Institut Pasteur de Lille and the Centre National de la Recherche Scientifique, and by grants from the Association pour la Recherche contre le Cancer, Ligue Nationale contre le Cancer and Groupement Français des Entreprises pour la Lutte contre le Cancer.

² To whom requests for reprints should be addressed. Phone: (33) 20.87.10.91; Fax: (33) 20.87.11.11; E-mail: vfafeur@infobiogen.fr.

³ Present address: Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA 98104.

⁴ The abbreviations used are: SF, scatter factor; HGF, hepatocyte growth factor; uPA, urokinase-plasminogen activator; EBS, ETS-binding site; PAI-1, plasminogen activator inhibitor type 1; HTLV, human T-cell lymphotropic virus; RRE, RAS responsive element; TIMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1; MDCK, Madin-Darby canine kidney; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase; CAT, chloramphenicol acetyltransferase.

thelial cells *in vitro*, increasing their motility and invasiveness (10). Further findings showed that SF is a multifunctional growth factor. SF is identical to HGF, an independently characterized mitogen, and behaves as an angiogenic factor (reviewed in Ref. 11). On the basis of expression patterns of SF/HGF in mouse and rat embryos (12, 13) and on studies demonstrating that SF/HGF induces cell dissociation, proliferation, and branching morphogenesis in a variety of epithelial cell types (10, 14), it has been postulated that SF/HGF helps to maintain epithelial-mesenchymal homeostasis. SF/HGF binds the *c-Met* proto-oncogene receptor (15), which contains in its intracellular portion a tyrosine kinase domain and multiple phosphorylation sites involved in transmitting cell signaling by SF/HGF (16–18). Following SF/HGF activation, the *c-Met* receptor is autophosphorylated and binds a number of intracellular proteins (19–22). It is thought that some of these proteins can transduce SF/HGF activation of RAS, because SF/HGF increases the level of RAS bound to GTP by stimulating guanine nucleotide exchange (23). A dominant-negative mutant of RAS was found to prevent motility induced by SF/HGF, indicating that RAS function is essential for mediating the motility signal of SF/HGF transduced by the *c-Met* receptor (24). However, little is known regarding further downstream pathways and effectors following RAS activation by SF/HGF. One approach to determine the transcriptional targets of the RAS pathway has been to identify the promoter elements that confer RAS-mediated transactivation. These promoter elements contain binding sites for the ETS and AP1 (FOS/JUN) transcription factors (25) or ETS/ETS binding sites oriented head to head (26). Initially identified in the polyoma virus enhancer, similar RAS-responsive elements were subsequently identified in various cellular promoters (27–30).

The aim of the present study was to investigate the involvement of the ETS1 transcription factor during situations of increased epithelial cell dissociation and motility. This was done both *in vivo* by describing *ETS1* expression during early organogenesis and *in vitro* by investigating signal transduction of SF/HGF in MDCK epithelial cells. In the chick embryo, we show that expression of *ETS1* occurs in epithelial cells during epithelial-mesenchymal transitions. In MDCK epithelial cells, we show that expression and transcriptional activity of ETS1 was stimulated by SF/HGF. These data identify ETS1 as a molecular actor of epithelial cell dissociation and extend the knowledge of ETS1 transcription factor being involved in dynamic cellular processes.

Results

Expression of *ETS1* mRNA during Somite Morphogenesis in the Developing Chick Embryo. In the vertebrate embryo, the segmentation of the lateral plate results in the formation of transient epithelial spheres, the somites, on both side of the notochord. Then, under the influence of various embryonic signals, the somites become patterned along the rostro-caudal axis into a ventral mesenchymal component, the sclerotome, and a dorsal epithelial component, the dermomyotome. We investigated *ETS1* mRNA expression in chicken embryos with 32–35 pairs of somites because the anterior to posterior progression of development allows ob-

servation of most stages of somite formation. *ETS1* is expressed (Fig. 1, B and F) when ventral somitic epithelial cells lose their junctions and scatter (Fig. 1A) to give rise to the sclerotome (Fig. 1, D–F). The same results were observed when somite formation was followed throughout development, in embryos with 7, 10, and 20 pairs of somites (data not shown). Later, the sclerotomal cells that have reached the notochord area, where they will form the skeletal elements of the vertebrae and ribs, no longer express *ETS1* (data not shown). In contrast, the dermomyotome, and its derivatives the dermatome and the myotome, kept an epithelial structure (Fig. 1, D and E) and did not express *ETS1* (Fig. 1F). Longitudinal sections corroborated these results, with homogeneous labeling of *ETS1* in sclerotomal cells of the somites (Fig. 1, H and I). The strong expression of ETS1 in the intersegmental spaces between the somites (Fig. 1, H and I) corresponds to the expected expression of *ETS1* in endothelial cells (3). Finally, at a later stage of embryo development, with 37–43 pairs of somites, *ETS1* expression was found to be induced, when the epithelial cells of the dermatome dissociate and migrate under the ectoderm of the forming dermis (data not shown). These results showed the expression of *ETS1* coincided with the scattering of the epithelial structure of the somite and of the dermatome, which correspond to situations of epithelial-mesenchymal transitions.

Expression of *ETS1* mRNA during the Scattering of Neural Crest Cells in the Developing Chick Embryo. Neural crest cells segregation from the neural epithelium is another example of a conversion of epithelial cells into cells displaying a mesenchymal phenotype. Transcripts encoding the extracellular matrix protein tenascin were used as a marker to map the migration pathways of neural crest cells (31, 32). As shown in Fig. 1A, *ETS1* was expressed both in the dorsal part of the neural tube and in streams of emigrating neural crest cells, and this expression pattern superimposed with that of tenascin (Fig. 1, compare B and C). Following segregation of neural crest cells, tenascin expression lined an early migratory pathway of neural crest cells along the inner side of the somite vesicle (Fig. 1C) and subsequent migratory pathways in the dorsal part of the dermomyotome, in cell clusters in the lateral parts of the sclerotome and in the dorsal part of the aorta (Fig. 1G) as demonstrated previously (31, 32). High levels of *ETS1* expression did not coincide with these pathways (Fig. 1, compare B and C, and F and G) but rather corresponded to early sclerotome individualization described above. In longitudinal sections (Fig. 1, H–J), expression of *ETS1* in sclerotomal cells did not superpose with expression of tenascin within the dermomyotome and the rostral part of the somites (Fig. 1, compare I and J). Thus, the segregation and scattering of neural crest cells from the neural epithelium correspond to another example of epithelial-mesenchymal transition being associated with *ETS1* expression.

Expression of *ETS1* mRNA during the Scattering of MDCK Cells. Epithelial MDCK cells seeded at low density grow as cell clusters. SF/HGF (10 ng/ml) caused scattering of these cell clusters within 24 h, although it was not able to induce cell proliferation, even after 5 days of culture (data not

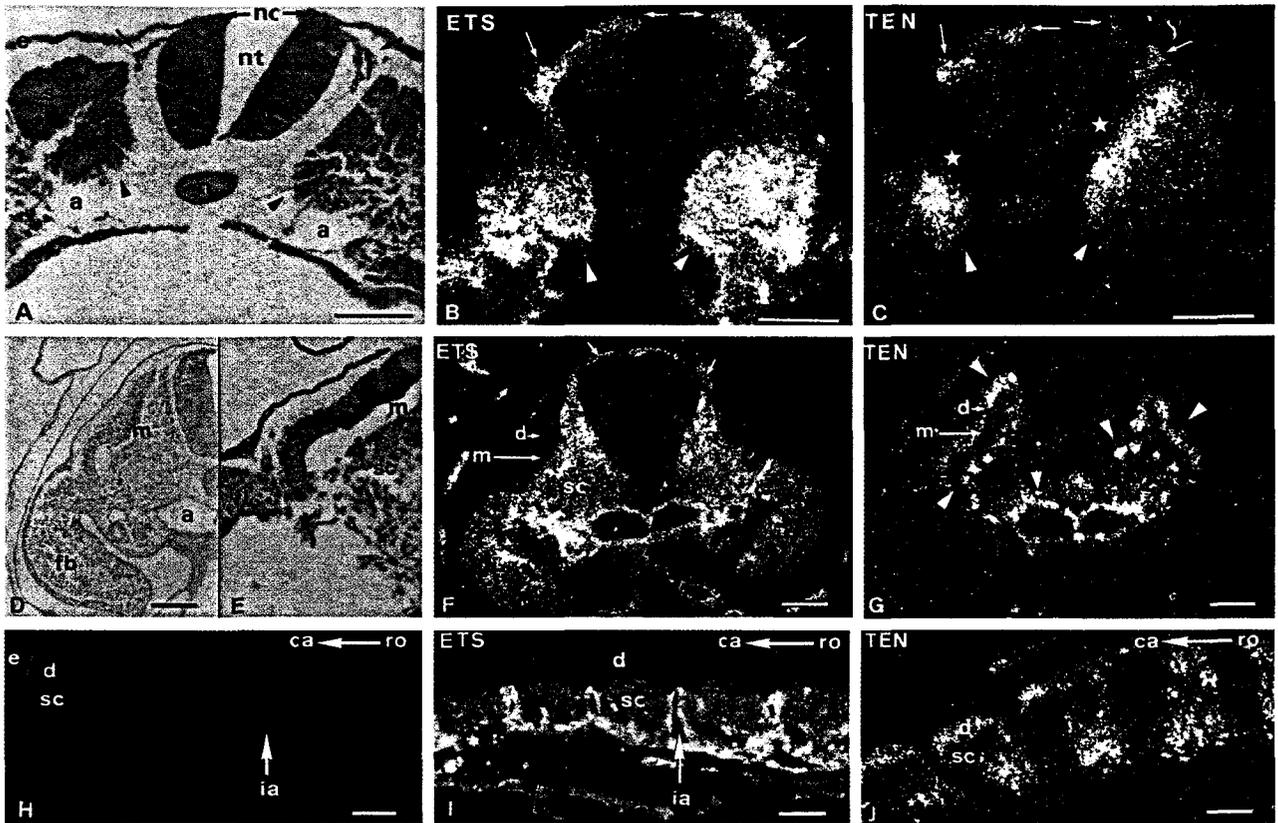


Fig. 1. Expression of ETS1 mRNA during epithelial-mesenchymal transitions in developing chick embryo. Sections from 32–35-somite embryos were stained using the 13F4 antibody and counterstained using Hansen's hematoxylin (A, D, and E) or hybridized with ETS1 (B, F, and I) or tenascin (C, G, and J) probes. Sections B, C, F, G, H, I, and J were counterstained with Hoechst 33258, a DNA intercalating dye. a, aorta; d, dermomyotome; e, ectoderm; fb, forelimb bud; ia, intersegmental artery; m, myotome; n, notochord; nc, neural crest; nt, neural tube; s, somite; sc, sclerotome. The yellow and white colors of the silver grains are photographic artifacts. Bars, 100 μ m. A–C, transverse sections at the level of the 32–35th somites. ETS1 mRNA (B) were abundant in neural crest cells both before and during their emigration from the neural epithelium, and this pattern of expression coincided with that of tenascin (C) that lines neural crest cell migration pathways (small arrows in A, B, and C). ETS1 (B) was also expressed in the ventral part of the dissociating somite (arrowheads), whereas tenascin (C) was expressed within the inner lateral part (stars) of the somites (compare A, B, and C). D–G, transverse sections at the level of the 15–20th somites. In D and E, the myotome emerging from the dermomyotome is labeled with the 13F4 antibody. E is a $\times 2$ enlarged view of D, showing the mesenchymal structure of the sclerotome and the epithelial structure of the dermomyotome and of the myotome. F, although scattering sclerotomal cells expressed ETS1, dermomyotomal and myotomal cells did not. Some neural crest cells still exhibit a weak ETS1 signal (small arrows in B and F). Expression of ETS1 was also detected in the forelimb bud and within the aorta, as described previously (3, 53). G, tenascin transcripts detected within the dermomyotome, the lateral parts of the sclerotome, and the dorsal part of the aorta (arrowheads) coincided with migratory pathways of neural crest cells (31, 54); however, tenascin transcripts detected within the notochord did not coincide with these pathways (31). H–J, longitudinal sections. I, a homogeneous ETS1 signal was detected in the sclerotome, whereas it was absent from the dermomyotome. The endothelial wall of intersegmental arteries was intensively labeled (arrow, the lumen of an intersegmental artery; see text). In J, tenascin was detected both in the dermomyotome and in the rostral half of the sclerotome. The arrow, between ro and ca, indicates the rostro-caudal orientation.

shown). The scattering process induced by SF/HGF results in progressive changes of their organization, including rupturing of desmosomal components, such as desmoplakin (Fig. 2, A and B). Using the *in situ* hybridization technique, we found that ETS1 mRNA was not detected in control cell clusters (Fig. 2C) and that the presence of SF/HGF (10 ng/ml) resulted in an increased level of expression of ETS1 mRNA (Fig. 2D). Although in some experiments we found a low level of ETS1 expression in basal conditions, the increased expression of ETS1 by SF/HGF was reproducibly observed. Interestingly, the ETS1 signal was higher at the periphery of the cell islets where cells start to detach from each other and to emigrate (Fig. 2D). These results suggested that scattering of the cell clusters induced by SF/HGF coincided with an increase in ETS1 mRNA expression.

Kinetic of Induction by SF/HGF of ETS1 mRNA and Protein Expression. In a time course experiment we found that addition of SF/HGF to MDCK cells resulted in a progressive increase in ETS1 mRNA levels, which was detectable by 4 h and persisted up to 24 h (Fig. 3). The induction of ETS1 expression at 4 h coincided with the onset of cell dissociation at the periphery of MDCK cell clusters (data not shown). Because it is known that SF/HGF stimulates extracellular proteolytic activity and that this effect may be related to the induction of motility in MDCK cells (33), we examined the expression of uPA and collagenase-1 mRNAs. The increased accumulation of uPA and collagenase-1 mRNAs correlated with the induction of ETS1 mRNAs, whereas the induction of PAI-1 mRNAs occurred earlier (2 h) and returned to basal levels by 8 h. The ability of SF/HGF to stimulate both expression of uPA and PAI-1, its inhibitor, appears to be a

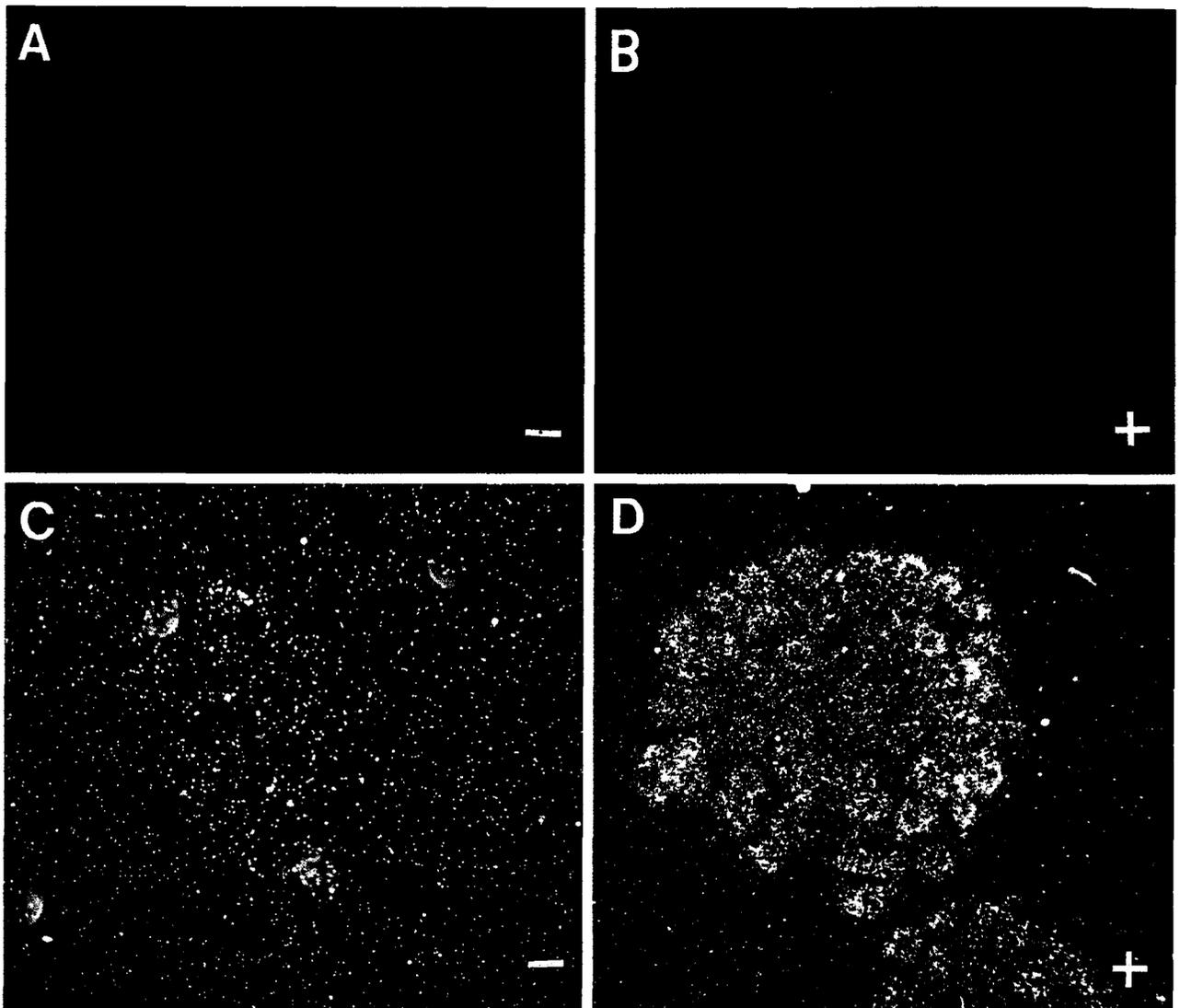


Fig. 2. Induction of ETS1 mRNA expression by SF/HGF in MDCK cells. MDCK cells were incubated with (+) or without (-) SF/HGF (10 ng/ml) for 8 h. At this time, most of the cell islets treated with SF/HGF had undergone cell dissociation. A and B, cells were processed for immunofluorescence using the anti-desmoplakin antibody. The progressive disappearance of immunoreactivity from cellular junctions in SF/HGF-treated cells is shown ($\times 1200$). C and D, ETS1 mRNAs were detected with an antisense probe by *in situ* hybridization. Shown are dark-field illuminations of the cells to visualize silver grains, after counterstaining with Hoechst 33258. C and D, $\times 400$.

consistent feature of growth factors inducing cell migration (34).

The amount of synthesized ETS1 proteins was measured by immunoprecipitation after 2, 4, and 8 h in the presence or absence of SF/HGF (10 ng/ml; Fig. 4). A major band was detected at a molecular weight of about M_r 50,000 with the ETS1 antiserum and was absent using its respective preimmune serum (data not shown). The size of this M_r ~50,000 protein band corresponds to the one of the previously described chicken p54 ETS1 or human p51 ETS1 protein (reviewed in Ref. 1). Minor specific bands were also detected above this M_r ~50,000 protein and may correspond to phosphorylated forms of this protein. We found that basal expression of ETS1 protein was detectable at all times examined and that addition of SF/HGF resulted in a progressive increase in ETS1 protein synthesis at 4 and 8 h.

The presence of other ETS family members, which can be coexpressed during epithelial-mesenchymal transitions (35) and/or share similar transcriptional activity (36) was investigated. We determined that both ETS1 and ETS2 (M_r ~60,000) can be expressed in MDCK cells, whereas ERG was not detectable (data not shown). The basal and SF/HGF-induced expression of ETS2 was transient, as compared with ETS1 (Fig. 4).

These results showed that ETS1 mRNA and protein expression induced by SF/HGF paralleled the increase in proteolytic enzymes, *uPA* and *collagenase*, gene expression, and changes in epithelial morphogenesis.

SF/HGF Stimulation of a Transcriptional Response from Specific Promoter Elements Containing ETS Binding Sites. The ability of SF/HGF to stimulate a transcriptional response involving ETS1 was evaluated in transient

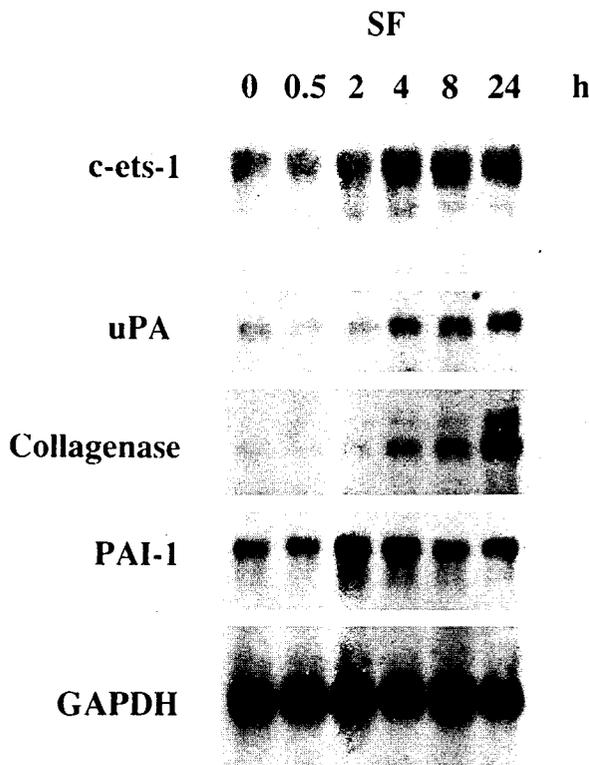


Fig. 3. Time course of ETS1 mRNA induction by SF/HGF. MDCK cells were treated for times ranging from 0 to 24 h with SF/HGF (10 ng/ml). *Left panel*, mRNAs were processed to perform Northern blot analysis and, the blot was hybridized with mouse ETS1, uPA, collagenase I, PAI-1, or GAPDH cDNA probes. GAPDH was used as a control for the amount of mRNA loaded onto the gel.

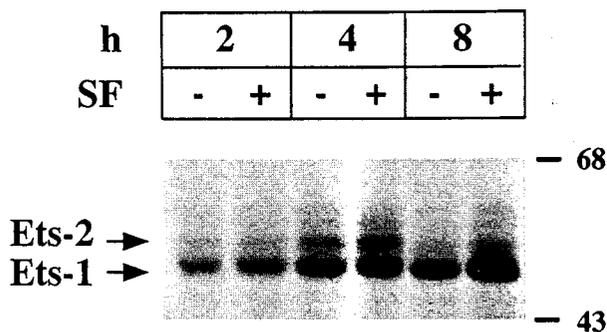


Fig. 4. Induction of ETS1 and ETS2 protein expression by SF/HGF. MDCK cells were treated for 2, 4, and 8 h with (+) or without (-) SF/HGF (10 ng/ml), in the presence of [³⁵S]methionine and [³⁵S]cysteine during the last 2 h of incubation. Extracted proteins were immunoprecipitated using the R2 antiserum. *Arrow*, position of the major ETS1 and ETS2 proteins; *right*, molecular weight markers.

transfection experiments using various promoter elements containing EBSs. The Py reporter vector contains ETS/AP1 (FOS/JUN)-binding sites (EBS/AP1); the E.18pal + 2 reporter vector contains ETS/ETS-binding sites oriented head to head (EBS/EBS) and the HTLV reporter vector, an ETS-binding site in close proximity of Sp1/ETS-binding sites (Sp1/EBS; Fig. 5). The choice of these promoter elements

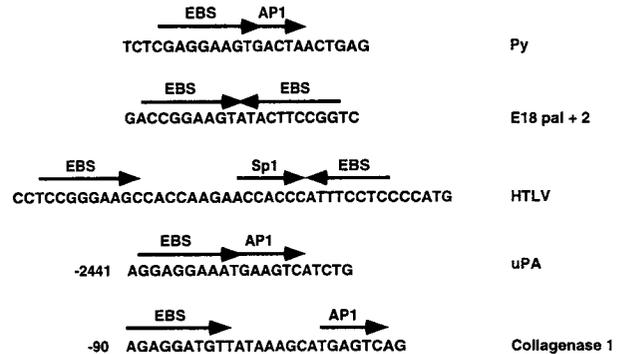


Fig. 5. Nucleotide sequence of the EBS, AP1, and Sp1 binding sites (arrows) within the Py, E18 pal+2, HTLV reporter vectors and those identified within the uPA and collagenase promoters (27, 36–38). The ETS core binding sequence is GGAA/T.

was based on the finding that ETS1 is a weak modulator of transcription from promoter sequences containing a unique ETS-binding site, whereas it is very efficient on promoter sequences containing an ETS-binding site in close proximity to other transcription factor-binding sites, including an ETS-binding site itself. We confirmed that all of these promoter elements were stimulated by cotransfection with ETS1 expression vector (Fig. 6). The addition of SF/HGF was found to stimulate transcription from the Py and E18.pal + 2 reporter vectors but not from the HTLV reporter vector (Fig. 6). Promoter activity measured at 24 h (Fig. 6) was detectable at 4 h, and similar results were obtained after 8- and 24-h periods of stimulation (data not shown). Another promoter sequence [E.18palm1 as described by Galang *et al.* (26)], containing a mutation in the first of the two ETS binding sites, was found not to be stimulated by SF/HGF, confirming that the two ETS/ETS-binding sites are necessary to confer SF/HGF responsiveness (data not shown).

We also investigated whether SF/HGF could stimulate transcription from cellular promoters that were identified by Northern hybridization, *i.e.*, the uPA and the collagenase promoter. These promoters contain an EBS/AP1 motif located ~2300 and ~90 bp, respectively, upstream of the transcription initiation site (Fig. 5); this motif responds to phorbol ester or growth factors and can also be transactivated by cotransfection of ETS1 in other cell types (27, 36–38). The uPA and the collagenase promoter activities were stimulated by SF/HGF and ETS1 as observed with the artificial Py and E18.pal + 2 reporter vectors (Fig. 6). These results demonstrate that SF/HGF can stimulate transcription from cellular promoter elements containing ETS-binding sites.

SF/HGF Induction of the Transcriptional Activity of ETS1 through the RAS Cascade. We next evaluated the involvement of RAS and ETS1 in mediating the stimulation of a transcriptional response by SF/HGF. It has been shown that the ETS/AP1- and the ETS/ETS-binding sites are sufficient to confer transactivation by activated RAS; these composite binding sites are also called RRE (26). Indeed, transfection of activated RAS stimulated transcription from the Py and E18pal + 2 reporter vectors and from the uPA and

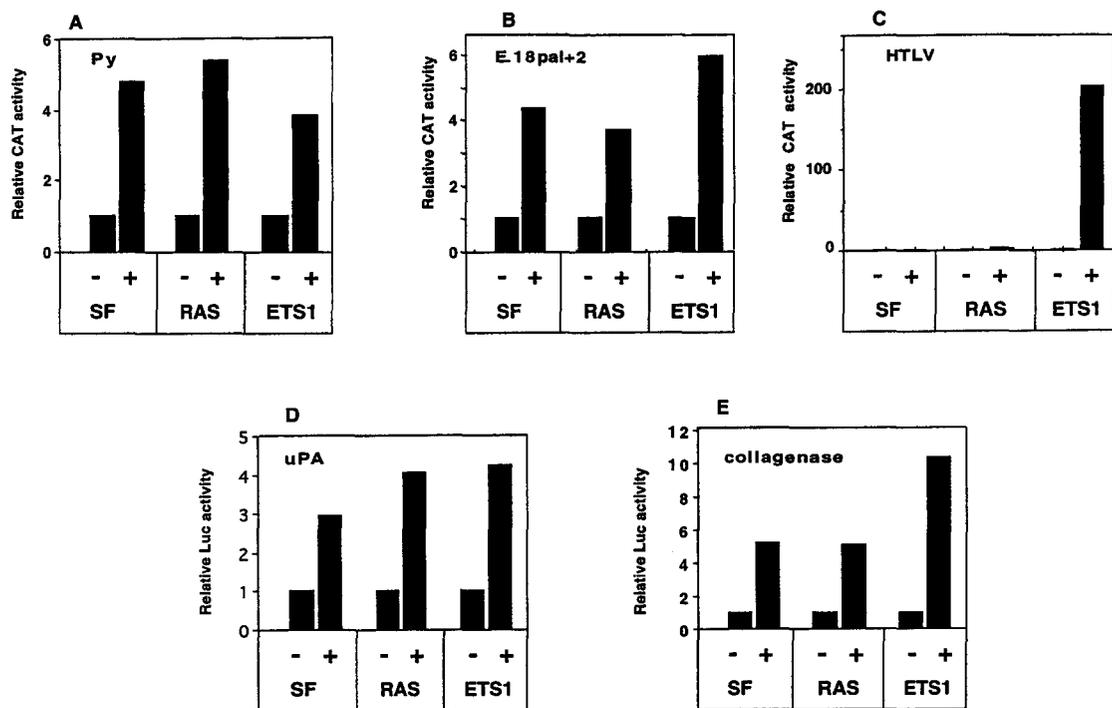


Fig. 6. SF/HGF stimulates transactivation from RAS-responsive promoter elements. MDCK cells were transfected with 0.3 μ g of the following reporter vectors: A, 3 \times pyRRE-tk-CAT (Py); B, Δ 56-FosdE-CAT (E.18pal+2); C, 2 \times HTLV1 LTR-tk-CAT (HTLV); D, -2446/-2356 uPA-luc (uPA); E, -517/+63 Coll-luc (collagenase), and as indicated cotransfected with (+) or without (-) expression vectors for ETS1 (pcDNA3-ETS1, 1 μ g) or RAS (1 μ g). The following day, cells were grown in DMEM-0.5% FCS, and SF/HGF (10 ng/ml) was (+) or was not (-) added. The cells were further incubated 24 h prior to assay for CAT or luciferase activity. The results show the relative level of expression of the indicator gene. This was calculated by dividing the level of expression of the CAT or luciferase reporter vector in the presence of transactivator by the level of expression in the absence of transactivator. The CAT activities of the reporters lacking the RAS-responsive elements did not vary significantly (data not shown). In C, the relative CAT activity of RAS compared to its respective empty expression vector was 2-fold, and this effect was not consistent in other experiments, confirming that Sp1/ETS-binding sites of the HTLV reporter vector do not behave as an efficient RAS-responsive element (26).

collagenase promoters, whereas it was inactive both from the HTLV reporter vector (Fig. 6) and from the E.18pal1 reporter vector with a single functional ETS binding site (data not shown).

We constructed an ETS1 mutant consisting in the DNA-binding domain of ETS1 (ETS1-DB), which acts as a dominant-negative mutant of ETS proteins (39). In control experiments, we established that expression of ETS1-DB did not inhibit transactivation of a heterologous factor, consisting in the DNA-binding domain of Gal4 linked to the VP16 transactivation domain (Gal4-VP16), assayed on a Gal4-tk-CAT reporter vector (40); in contrast, ETS1-DB was able to inhibit transactivation induced by cotransfection with ETS1 on the Py reporter vector (data not shown). This ETS1-DB expression vector was able to inhibit both basal and SF/HGF- or RAS-stimulated transactivation of the Py reporter vector (Fig. 7) in a dose-dependent manner (data not shown) and of the uPA and collagenase promoters (Fig. 7), showing that ETS proteins are involved in constitutive and SF/HGF- or RAS-mediated induction of transcriptional activity. It should be noted that SF/HGF-stimulated and basal activities could be mediated by the same factors.

These results did not identify the ETS protein involved, because the ETS1-DB mutant protein is able to bind the EBS motif and to prevent the action of any related member of the

ETS family that may be present in MDCK cells. To address the relationships between SF/HGF and ETS1, we investigated whether SF/HGF or RAS influenced ETS1 activation. We predicted that, if ETS1 is a target of SF/HGF or RAS signal-transducing pathways, SF/HGF or RAS might enhance ETS1 activation. Cotransfection of the cells with activated RAS (1 μ g/ml) and ETS1 (1 μ g/ml) resulted in a synergistic stimulation of the Py reporter vector activity, compared with RAS or ETS1 alone (Fig. 8). A similar synergistic effect was obtained when MDCK cells transfected with ETS1 (1 μ g/ml) were stimulated by SF/HGF (10 ng/ml), compared with ETS1 or SF/HGF alone (Fig. 8). The ability of SF/HGF or RAS to enhance ETS1 transactivation was not merely due to an increase in the amount of ETS1 through a possible RRE in the ETS1 expression vector, because we did not obtain a further increase in transactivation using the ETS1 expression alone, above the concentration of 1 μ g/ml (data not shown).

The specificity of the effect of ETS1 was also addressed by comparing its effect to other ETS family members. We found that ETS1 and ETS2 behaved similarly, *i.e.*, they were able to stimulate the Py reporter vector activity and to synergize with SF/HGF, whereas the ERG protein was found to act as a transcriptional repressor, both in the absence or presence of SF/HGF (Fig. 9). We thus determined that not all ETS family

Fig. 7. Dominant-negative mutants of ETS suppress the transactivating potential of SF/HGF or activated RAS. MDCK cells were cotransfected with 0.3 μ g of the reporter vector: **A**, 3 \times pyRRE-tk-CAT (*Py*); **B**, -2446/-2356 uPA-luc (*uPA*); **C**, -517/+63 Coll-luc (*collagenase*) in the presence (■) or absence (□) of ETS1-DB (1 μ g) expression vector, with or without activated RAS (1 μ g). The following day, cells were grown in DMEM-0.5% FCS in the presence or absence of SF/HGF (10 ng/ml), 24 h prior to the assay for CAT or luciferase activity.

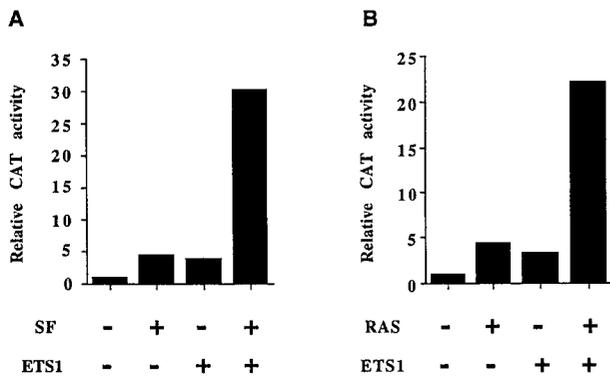
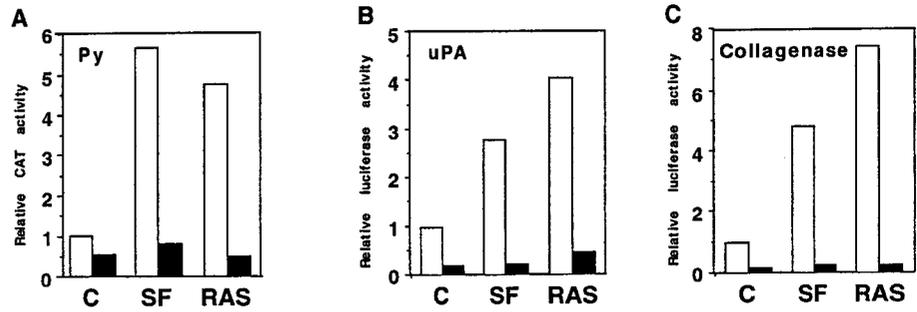


Fig. 8. SF/HGF or activated RAS enhance ETS1 activation. In **A**, MDCK cells were cotransfected with *Py* reporter vector (0.3 μ g) and pcDNA3-ETS1 (1 μ g) expression vector. The following day, cells were grown in DMEM-0.5% FCS in the presence or absence of SF/HGF (10 ng/ml), 24 h prior to the assay for CAT activity. In **B**, cells were cotransfected with *Py* reporter vector (0.3 μ g) and expression vectors for ETS1 (pcDNA3-ETS1, 1 μ g) and/or activated RAS (1 μ g). The following day, cells were grown in DMEM-0.5% FCS and harvested 24 h later for analysis of CAT activity.

members can act as positive regulators of a transcriptional response induced by SF/HGF involving the RAS cascade.

Discussion

The main characteristic of *ETS1* expression in embryos and in human tumors is its specific expression in mesodermal cell derivatives, such as endothelial cells during angiogenesis and mesenchymal cells when epithelial-mesenchymal interactions occur (3–9). In contrast, most studies did not show *ETS1* expression in epithelial structures (7). Nonetheless, during neurulation and somitogenesis, epithelia form transient structures, such as the neural crest and the somites, and in both cases we demonstrated that *ETS1* expression was associated with their conversion into mesenchymal structures. By examining available information of *ETS1* expression during development in embryos, we found that the earliest expression of *ETS1* was detected during gastrulation in the mesoderm, when the three germinal cell layers, ectoderm, endoderm, and mesoderm are formed (7). Whereas the ectoderm and endoderm remain largely epithelial in character, the newly induced mesoderm is the first example in ontogenesis of conversion of epithelial cells to mesenchyme. Taken together, these results show that *ETS1* expression is induced in dissociating epithelial cells, during epithelial-mesenchymal transitions occurring during early development.

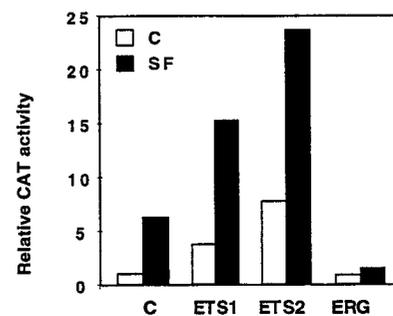


Fig. 9. Specificity of action of ETS proteins on transactivation induced by SF/HGF. MDCK cells were cotransfected with *Py* reporter vector (0.3 μ g) and 1 μ g of pSG5 expression vectors for ETS1, ETS2, or ERG. The following day, cells were grown in DMEM-0.5% FCS in the presence or absence of SF/HGF (10 ng/ml), 24 h prior to the assay for CAT activity.

On the basis of this observation, we hypothesized that a physiological modulator of epithelial cell dissociation and motility could regulate *ETS1* expression. We have explored this possibility using the MDCK epithelial cell system, which is a very sensitive functional assay for SF/HGF-scattering activity. In this cell system, SF/HGF promotes cell motility and invasiveness but has no mitogenic activity as demonstrated in some other epithelial cells (data not shown). In time course experiments, we showed that after SF/HGF treatment, *ETS1* mRNA accumulated after 4 h until 24 h. This pattern of expression suggests that *ETS1* might be a delayed-early response gene to SF/HGF, as has been demonstrated for the *c-Met* gene in human A549 epithelial cells (41). Although very few studies have allowed identification of the physiological factors able to regulate *ETS1* expression, it is worth noting that in human fibroblasts, we recently reported similar kinetics of the *ETS1* response after stimulation by growth factors acting through receptors with intrinsic tyrosine kinase activity, such as basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor, which contrasted with the early *ETS1* response (within 30 min) to cytokines acting through receptors devoid of tyrosine kinase activity, such as tumor necrosis factor α and interleukin 1 α ; this study allowed us to demonstrate that increased *ETS1* expression by growth factors versus cytokines can occur through distinct signal transduction mechanisms (42). In the present study, we also found that SF/HGF-induced *ETS1* mRNA expression was mostly detected at the periphery of the MDCK cell islets when cells start to detach and emigrate. These results show

that SF/HGF can stimulate ETS1 expression in MDCK cells and that the profile of ETS1 expression is correlated with morphological changes and the expression of protease genes.

To assess the functional significance of ETS1 expression in MDCK cells, we investigated whether SF/HGF could stimulate the transcriptional activity of ETS1. In response to SF/HGF, the intracellular portion of the c-Met receptor becomes autophosphorylated (19) and binds to a number of proteins, including phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase C- γ , pp60^{c-src}, Grb-2, SHC, and GAB1 (19–22). Among the possible transduction pathways activated by these proteins, a pathway leading to RAS activation appears to play an essential role in cell motility. SF/HGF increases the level of GTP bound to RAS by stimulation of guanine nucleotide exchange (23). Infection of MDCK cells with a Ha-RAS-transducing retrovirus can produce scattered cell clones (43), and a dominant-negative mutant of RAS under the control of an inducible metallothionein promoter has been shown to prevent scattering of MDCK cells (24). Nuclear targets of the RAS pathway have recently been identified and comprise promoter elements containing ETS/ETS- and ETS/AP1-binding sites. We found that SF/HGF was able to induce a transcriptional response from these promoter elements, whereas it was inefficient on a promoter element containing Sp1/ETS-binding sites. Furthermore, we showed that transcriptional activation stimulated by SF/HGF or by oncogenic RAS was potentiated by ETS1 and inhibited by dominant-negative mutants of ETS1. These results demonstrate that the transcription factor ETS1 can act as a downstream effector of the RAS cascade in SF/HGF-stimulated MDCK cells. They also define a functional requirement for ETS1 in the activation of the RAS-responsive elements by SF/HGF. This led us to propose a model of signal transduction by SF/HGF where following activation of its receptor, SF/HGF can activate sequentially RAS and ETS1, resulting in activation of specific nuclear target promoters containing ETS-binding sites.

Such RAS-responsive elements containing essential ETS/AP1- or ETS/ETS- binding sites have been identified in promoters or enhancers regions of various genes, such as genes encoding extracellular proteases uPA (36, 37), collagenase-1 (27, 38), and stromelysin-1 (28). A role for ETS1 in the transcriptional activation of protease genes by SF/HGF during cellular dissociation is an attractive hypothesis, because these enzymes belong to a complex enzymatic cascade that degrades the extracellular matrix and may contribute to the motility of the cells. Our data are in agreement with this hypothesis, because we show that SF/HGF induced a parallel accumulation of the steady-state levels of the *ETS1* and *uPA* and *collagenase* mRNAs and that the gene promoters of the *uPA* and *collagenase* can be transcriptionally regulated by SF/HGF through involvement of the RAS cascade and ETS1 proteins. It should be specified that SF/HGF induction of ETS1 expression and transcriptional activity might represent two different aspects of ETS1 involvement in transmitting SF/HGF signal. SF/HGF may stimulate rapidly the transcriptional activity of ETS1 by triggering a series of phosphorylation of kinases following RAS activation,

whereas it induces *ETS1* mRNA accumulation within several hours of stimulation (Fig. 3). We propose that by increasing the amount of available ETS1, this delayed effect of SF/HGF could amplify the responsiveness of the cells on specific target genes containing RAS-responsive elements. Overall, the identification of functional RAS-responsive elements in signal transduction by SF/HGF forms the basis for identifying gene targets of SF/HGF and for a more detailed examination of the transcription factors involved in SF/HGF responsiveness.

ETS1 belongs to a family of transcription factors that recognize similar DNA motifs (1, 2). It was of interest to address the question of the specificity of their effects and of their possible functional redundancy. ETS1, ETS2, and ERG are closely related members within the ETS family (44), and their patterns of expression during development have been reported (3, 6, 35). In embryos, *ETS1* and *ERG* are similarly expressed at early stages of development, including during neural crest emigration and sclerotome formation, whereas at later stages, they have a more restricted and exclusive pattern of expression (35). In contrast, developmental expression of *ETS2* is spatially and temporally different, without characteristic expression during epithelial cell dissociation of the neural crest and of the somite (6). By examining both expression and transcriptional activity of these ETS proteins in MDCK cells, we found that ETS1 and ETS2 can share similar transcriptional activity, albeit with a distinguishable regulation of expression; both in basal and SF/HGF-stimulated conditions, the expression of ETS2 was transient compared to ETS1. We also found that ERG is not expressed in MDCK epithelial cells and have an opposite effect to the one of ETS1; ETS1 and ERG were activator and repressor of transcription from a RAS-responsive promoter element, respectively. It is, therefore, possible that ETS1 and other ETS family members can play a role during epithelial cell dissociation or in signal transduction by SF/HGF. Nonetheless, we found the expression and/or transcriptional activity of ETS1 is specific compared to ETS2 or ERG.

Because ETS1 expression is induced by SF/HGF in MDCK epithelial cells, we examined whether the pattern of expression of *ETS1* overlaps with those of *SF/HGF* and of its receptor *c-Met* in the situations that we have described in the chick embryo. During early stages of vertebrate development, *ETS1* transcripts are detected in epithelial cells when the expression of *SF/HGF* and *c-Met* are associated with the dispersion of epithelial structures, i.e., gastrulation and early emigration of neural crest cells (45, 46). In these situations in the embryo, SF/HGF could act as an autocrine factor and stimulate *ETS1* expression. *ETS1* transcripts are also detected during dissociation of ventral somitic epithelial cells that give rise to the sclerotome, another well known situation of epithelial-mesenchymal transition. During this process, only a weak expression for *SF/HGF* and no expression for *c-Met* have been detected in the sclerotome (45, 46). Therefore, in this situation, expression of *ETS1* does not correlate with the expression of *c-Met*. Rather, *c-Met* was found to be expressed in the dermomyotome and in cells that migrate from the dermomyotome (45–47), where *ETS1* expression was not detected. Several lines of evidence suggest that

these cells correspond to myogenic precursor cells and that *SF/HGF* expressed in neighboring mesenchymal cells of the limb bud induces their scattering and migration (47). Finally, *ETS1* expression was found to be induced at a later stage, when the cells forming the epithelial structure of the dermatome dissociate and migrate under the ectoderm of the forming dermis. Expression of *SF/HGF* and *c-Met* were not reported during this process. It appears, therefore, that co-expression of *ETS1* and *c-Met* does not occur in all situations of epithelial-mesenchymal transitions during early embryo development. Whether other members of the *ETS* family or of the *c-Met* subfamily of tyrosine kinase receptors are associated with such transitions occurring in the absence of *ETS1* and *c-Met*, respectively, remain to be investigated. There is now considerable interest in identifying the effectors of epithelial-mesenchymal interactions at a molecular level. Our study demonstrate that expression of *ETS1* can be associated with dissociation of epithelial structures, allowing the cells to acquire more motile properties. This now has to be investigated by experimental embryological methods.

Materials and Methods

Preparation of Embryos. Chicken eggs were incubated at 37°C in a humidified chamber during approximately 60 h, until embryos had formed 32–35 pairs of somites. Whole embryos were fixed at 4°C for 16 h in 4% paraformaldehyde in PBS, dehydrated, and embedded in paraffin. Seven μm -thick tissue sections were transferred to slides, as reported previously (3). To describe the appearance of the myotome, we used the 13F4 monoclonal antibody, kindly supplied by Dr C. Ziller (Institut d'Embryologie, Nogent sur Marne, France). This antibody recognizes a cytoplasmic marker expressed in the myotome, as soon as the first myotomal cells migrate along the dermatome. Immunohistochemistry was performed using the biotin-extravidin kit (Sigma Chemical Co.) according to the manufacturer's specifications.

In Situ Hybridization. *In situ* hybridization was performed according to Quéva *et al.* (48). Probes were as follows: a 750-bp *Bgl*II-*Hind*III fragment of the chicken *ETS1* cDNA (3); and a *tenascin* probe synthesized from plasmid pCTN-230 containing the full 6-kb coding sequence of the *M*, 230,000 variant of chicken *tenascin* (a generous gift of Dr Chiquet-Erismann, Basel, Switzerland). The probe used for detection of *ETS1* in MDCK epithelial cells was transcribed from the *Eco*RI 825-bp fragment of the human *ETS1* cDNA (9). Antisense and sense [³⁵S]RNA probes were transcribed from linearized plasmids using either T7 or T3 RNA polymerase in a reaction mixture containing [³⁵S]UTP and [³⁵S]CTP, with a specific activity ≥ 1000 Ci/mmol. No specific signals were observed when transcripts in sense orientation were used for hybridization.

Cell Culture and Dissociation Assays. MDCK cells (kindly provided by Dr. J. Jouanneau, Institut Curie, Paris, France) were cultured in DMEM (Life Technologies, Inc.) supplemented with 10% FCS and antibiotics at 37°C. Natural purified human SF/HGF was kindly provided by Dr. K. M. Weidner (Max Delbrück Centrum, Berlin, Germany). We also used recombinant human SF/HGF (R&D Systems). For the dissociation assays, $2-5 \times 10^4$ MDCK cells were seeded onto glass coverslips in 12-well plates and cultured for 2–3 days in DMEM-10% FCS. The medium was then replaced by 1 ml DMEM free of serum, with or without 10 ng/ml of SF/HGF. At the end of the experiments, cells were either processed for *in situ* hybridization analysis or were colored in Giemsa stain (Sigma), and their morphologies were examined by phase contrast microscopy.

Immunofluorescence Microscopy. MDCK cells were cultured as indicated for cell dissociation assays on glass coverslips and were treated or not with 10 ng/ml SF/HGF. Cells were fixed at -20°C with methanol/acetone (*v/v*) for 5 min. As a marker of the epithelial junction, we used a rabbit polyclonal antibody raised against desmoplakin (Boehringer Mannheim), a desmosome-specific protein. This antibody was applied for 1 h, followed by 30-min incubation with FITC-coupled goat anti-rabbit IgG. Coverslips were mounted in Mowiol containing 2.5% (*w/v*) DABCO (Sig-

ma) to reduce fading and viewed in an Axioscope epifluorescence microscope.

Cellular RNA Isolation and Northern Blot Analysis. MDCK cells (1.5×10^5 cells/100 mm-dish) were grown in DMEM-10% FCS. The medium was replaced the following day (day 1) by DMEM-0.5% FCS and on day 2 by fresh DMEM-0% FCS containing 10 ng/ml SF/HGF. At various times, total RNAs were isolated using the guanidinium isothiocyanate/CsCl method as described previously (42). RNAs (15 μg) were separated by electrophoresis on a 1.2% agarose gel and transferred onto nitrocellulose filters (Hybond-C extra; Amersham Corp.). The filters were hybridized overnight at 42°C with a [³²P]cDNA probe in hybridization buffer [1 volume of 50% dextran sulfate (*w/v*), 4 volumes of prehybridization buffer containing 50% formamide, 1 M NaCl, 1% SDS, 5 \times Denhardt's solution, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denatured salmon sperm DNA]. After washing, the filters were exposed to Hyperfilm MP (Amersham).

cDNA Probes. Probes were prepared from the following cDNA fragments: the entire 1.6-kb *Bam*HI fragment of the mouse *ETS1* cDNA (49); the *Pst*I-*Hind*III 660-bp fragment of the mouse *uPA* cDNA (50); the *Eco*RI-*Pst*I 600-bp fragment of the incomplete bovine *PAI-1* cDNA (34); the *Hind*III-*Not*I fragment of the mouse *collagenase 1* cDNA (51); and the 1.3-kb *Pst*I fragment of the rat *GAPDH* cDNA. These cDNA probes were labeled with [³²P]dCTP (3000 Ci/mmol; ICN), using a nick-translation kit (Amersham).

Cell Labeling and Immunoprecipitation. MDCK cells (1.5×10^5 cells/100 mm-dish) were cultured for 2–3 days in DMEM-10% FCS. The media was replaced for 1 h by methionine- and cysteine-free MEM (MEM-Met⁻, Cys⁻; Life Technologies, Inc.). Cells were then incubated for several hours in fresh MEM-Met⁻, Cys⁻, with or without SF/HGF, and [³⁵S]-L-methionine and [³⁵S]-L-cysteine (Tran³⁵S-Label; 1066 Ci/mmol; ICN) were added (250 $\mu\text{Ci}/3$ ml) during the last 2 h of incubation. At the end of the experiments, cells were lysed and processed for immunoprecipitation as described (42). Briefly, identical trichloroacetic acid-precipitable counts of proteins were immunoprecipitated and separated onto 10% SDS-polyacrylamide gels. Gels were fixed and treated with DMSO-PPO for autoradiographic enhancement and exposed for autoradiography using Hyperfilm-MP.

Antisera. The R2 *ETS1* antisera was raised against amino acids 27–136 of the chicken p54-*ETS1* protein. A DNA fragment was PCR amplified using p54 *ETS1* cDNA as a template and the following pair of primers containing synthetic *Bam*HI and *Hind*III sites: 5'-TTGTCATGGGATCCTGATATGGAATGTGCAGATGTGCCCTTTGTA-3' and 5'-GCAGCCAAGCTGTACTCTTCTTCTGCAAGATCTCCAGGTGTTCCTCA-3'. The PCR-amplified fragment was cloned into the *Pic24* expression vector. The polypeptide was purified, and rabbit polyclonal antisera were obtained as described previously (35). This *ETS1* sequence is 62% identical to the corresponding sequence in chicken *ETS2* protein. In control experiments, we established that the fourth bleeding used in this study was able to recognize both *ETS1* and *ETS2*. The anti-ERG polyclonal antibody (A204) was characterized previously (35).

Plasmid Constructions. The activated RAS expression vector (a generous gift of Dr J. Bell, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada) was obtained by cloning a 6.6-kb *Bam*HI fragment of the human *c-Ha-RAS EJ* cDNA into pSV2neo. The full-coding sequence of the mouse *ETS1* cDNA was cloned into the *Bam*HI site of pcDNA3 expression vector (Invitrogen). The fragment encoding the *ETS1* DNA-binding domain (*ETS1-DB*), corresponding to the mouse *ETS1* amino acids 323–440, was obtained by PCR using mouse *ETS1* cDNA as a template and the following pair of primers, 5'-AGGATCCGAGAATATGGCTGCTGCCCTGGCTGGC-3' and 5'-TGGATCCCTAGTCAGCATCCGGCTTTAC-3', and cloned into the *Bam*HI site of pcDNA3. The chicken, mouse, and human *ETS1-DB* sequences were 100% identical. After nucleotide sequencing of the 5' and 3' boundaries of the *ETS1-DB* insert, we verified protein expression from the *ETS1-DB* expression constructs, using an *in vitro* protein translation system (Promega Corp.). The SV40 promoter-based, pSG5 expression vectors for p58 human *ETS2* and p55 human *ERG* have been described previously (25), and the pSG5 expression vector for mouse *ETS1* was kindly provided by Dr. P. Martin (Pasteur Institute, Lille).

The reporter vectors used where as follows: Py (3 \times pYRE-tk-CAT) described by Wasyluk *et al.* (25) contains three tandem copies of a polyoma-virus enhancer derived sequence with *ETS/AP1*-binding sites; E.18pal + 2 contains a single copy of two *ETS/ETS*-binding sites oriented head to head inserted in $\Delta 56$ FosD-CAT (26); HTLV (HTLV1 LTR-tk-CAT)

contains two tandem copies of a HTLV1 LTR sequence with a single ETS-binding site and a juxtaposed Sp1/ETS binding sites (52); uPA (-2446, -2356 uPA-luc, pGL99), provided by Dr. Ostrowski (30), contains a 90-bp *Hae*III fragment of the mouse uPA promoter (-2446, -2356) linked to the uPA proximal promoter (-114, +398) and drives the *luciferase* reporter gene; and *collagenase* (-517, +63 Coll luc) provided by Dr. Cato (38) contains the indicated region of the human *collagenase 1* promoter sequence linked to the *luciferase* gene. The nucleotide sequence of the EBS, AP1, and Sp1 binding sites present within these reporter vectors are shown in Fig. 5.

Transactivation Assays. MDCK cells (5×10^4 cells/35-mm dish) were cultured for 24 h and then transiently transfected using a lipofection method. Cells were rinsed and incubated in 1 ml of OptiMEM (Life Technologies, Inc.) with a mixture of DNA (maximal amount, 3 μ g) and lipofectamin (20 μ g; Boehringer Mannheim). In each experiment, plates were incubated with the same total amount of plasmid DNA, completed as necessary with the corresponding empty expression vector. After 6 h, 1 ml of DMEM containing 20% FCS was added, and cells were further incubated overnight. The cells were then rinsed and incubated in DMEM-0.5% FCS in the presence or absence of SF/HGF. Twenty-four h later, cells were harvested and disrupted in lysis buffer (Promega). The supernatant was assayed for protein content (Bio-Rad protein assay) and processed for CAT or luciferase assays. For CAT assays, reaction mixtures, containing 25 μ g of the cell extract, 50 nCi of [14 C]chloramphenicol, and 0.5 mM acetyl CoA, were incubated for 1–2 h at 37°C. The reaction products were separated onto TLC sheets (Macherey-Nagel) and visualized by autoradiography. Quantification of CAT activities was determined by calculating the ratio of acetylated versus nonacetylated [14 C]chloramphenicol using a PhosphorImager (Molecular Dynamics, Inc.). For luciferase assays, reaction mixtures, containing 20 μ l of the cell extract and 85 μ l of luciferase assay buffer [25 mM Tris phosphate (pH 7.8), 8 mM MgCl₂, 1 mM DTT, Triton X-100 1% v/v, and glycerol 15% v/v] were measured in a Berthold Lumat LB9501 luminometer following injection of luciferine assay solution (0.25 mM luciferine and 2 mM ATP in a luciferase assay buffer). The value obtained was normalized to the protein content of the cell extract. Duplicate samples were performed in each experiment, and individual values did not differ by more than 10% of the mean. Each experiment was repeated at least three times with independent plasmid preparation to assess reproducibility. Transfection efficiency was routinely of 5–10%, as monitored independently by assay of β -galactosidase activity, following transfection of a pSG5-lacZ plasmid.

Acknowledgments

We thank Catherine Ziller for providing the 13F4 antibody, Jacqueline Jouanneau for the MDCK cells, Michael K. Weidner for the SF/HGF protein, Ruth Chiquet-Erismann for the *tenascin* probe, Craig Hauser for the RRE- Δ 56 Fos dE-CAT plasmids, Michael Ostrowski for the uPA-luciferase plasmid, and Andrew Cato for the collagenase-luciferase plasmid. We are particularly indebted to Sophana Ung, Fabienne Denhez, and Kay MacLeod for the anti-ETS1 sera and Martine Duterque for the anti-ERG sera. We thank as well Raymond Pierce and Jean Coll for critical reading of the manuscript.

References

- Wasylyk, B., Hahn, S. L., and Giovane, A. The Ets family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.*, 277: 7–18, 1993.
- Crépieux, P., Coll, J., and Stéhelin, D. The Ets family of proteins: weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners. *Crit. Rev. Oncog.*, 5: 615–638, 1994.
- Vandenbunder, B., Pardanaud, L., Jaffredo, T., Mirabel, M. A., and Stéhelin, D. Complementary patterns of expression of *c-ets 1*, *c-myc* and *c-myc* in the blood-forming system of the chick embryo. *Development (Camb.)*, 107: 265–274, 1989.
- Quéva, C., LePrince, D., Stéhelin, D., and Vandenbunder, B. p54^{c-ets-1} and p68^{c-ets-1}, the two transcription factors encoded by the *c-ets-1* locus, are differentially expressed during the development of the chick embryo. *Oncogene*, 8: 2511–2520, 1993.
- Kola, I., Brookes, S., Green, A. R., Garber, R., Tymms, M., Papas, T. S., and Seth, A. The *Ets1* transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenetic processes such as organ formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7588–7592, 1993.
- Maroulakou, I. G., Papas, T. S., and Green, J. E. Differential expression of *ets-1* and *ets-2* proto-oncogenes during murine embryogenesis. *Oncogene*, 9: 1551–1565, 1994.
- Vandenbunder, B., Quéva, C., Desbiens, X., Wernert, N., and Stéhelin, D. Expression of the transcription factor *c-Ets-1* correlates with the occurrence of invasive processes during normal and pathological development. *In: J.-P. Thiery and B. Sordat (eds.)*, Invasion and Metastasis, Vol. 14, pp. 198–209. Basel: Karger, 1995.
- Wernert, N., Raes, M.-B., Lassalle, P., Dehouck, M.-P., Gosselin, B., Vandenbunder, B., and Stéhelin, D. *c-ets-1* proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularisation and other forms of angiogenesis in man. *Am. J. Pathol.*, 140: 119–127, 1992.
- Wernert, N., Gilles, F., Fafeur, V., Bouali, F., Raes, M.-B., Pyke, C., Dupressoir, T., Seitz, G., Vandenbunder, B., and Stéhelin, D. Stromal expression of *c-ets1* transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res.*, 54: 5683–5688, 1994.
- Stoker, M., Gherardi, E., Peryman, M., and Gray, J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial mobility. *Nature (Lond.)*, 327: 239–242, 1987.
- Rosen, E. M., Nigam, S. K., and Goldberg, I. D. Scatter factor and the c-met receptor: a paradigm for mesenchymal/epithelial interaction. *J. Cell Biol.*, 127: 1783–1787, 1994.
- Sonnenberg, E., Meyer, D., Weidner, K. M., and Birchmeier, C. Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J. Cell Biol.*, 123: 223–235, 1993.
- Defrances, M. C., Wolf, H. K., Michalopoulos, G. K., and Zarnegar, R. The presence of hepatocyte growth factor in the developing rat. *Development (Camb.)*, 116: 387–395, 1992.
- Montesano, R., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Orci, L. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell*, 67: 901–908, 1991.
- Naldini, L., Weidner, K. M., Vigna, E., Gaudino, G. K., Bardelli, A., Ponzetto, C., Narsimhan, R. P., Hartmann, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G., Birchmeier, W., and Comoglio, P. M. Scatter factor and hepatocyte growth factor are undistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J.*, 10: 2867–2878, 1991.
- Longati, P., Bardelli, A., Ponzetto, C., Naldini, L., and Comoglio, P. M. Tyrosines^{1234–1235} are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the *MET* proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene*, 9: 49–57, 1994.
- Zhu, H., Naujokas, M. A., Fixman, E. D., Torossian, K., and Park, M. Tyrosine 1356 in the carboxy-terminal tail of the HGF/SF receptor is essential for the transduction of signals for cell motility and morphogenesis. *J. Biol. Chem.*, 269: 29943–29948, 1994.
- Weidner, K. M., Sachs, M., Riethmacher, D., and Birchmeier, W. Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 2597–2601, 1995.
- Bardelli, A., Maine, F., Gout, I., Fry, M. J., Waterfield, M. D., Comoglio, P. M., and Ponzetto, C. Autophosphorylation promotes complex formation of recombinant hepatocyte growth factor receptor with cytoplasmic effectors containing SH2 domains. *Oncogene*, 7: 1973–1978, 1992.
- Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graaziani, A., Panayotou, G., and Comoglio, P. M. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell*, 77: 261–271, 1994.
- Pellicci, G., Giordano, S., Zhen, Z., Salcini, A. E., Lanfranccone, L., Bardelli, A., Panayotou, G., Waterfield, M. D., Ponzetto, C., Pellicci, P. G., and Comoglio, P. M. The mitogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the SHC adaptor protein. *Oncogene*, 10: 1631–1638, 1995.
- Weidner, K. M., Di Cesare, S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J., and Birchmeier, W. Interaction between Gab1 and the c-met receptor

- tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature (Lond.)*, **384**: 173–176, 1996.
23. Graziani, A., Gramaglia, D., dalla Zonca, P., and Comoglio, P. M. Hepatocyte growth factor/scatter factor receptor stimulates the ras-guanine nucleotide exchanger. *J. Biol. Chem.*, **268**: 9165–9168, 1993.
 24. Hartmann, G., Weidner, K. M., Schwarz, H., and Birchmeier, W. The motility signal of scatter factor/hepatocyte growth factor mediated through the receptor tyrosine kinase Met requires intracellular action of ras. *J. Biol. Chem.*, **269**: 21936–21939, 1994.
 25. Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D., and Stéhelin, D. The *c-ets* proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature (Lond.)*, **346**: 191–193, 1990.
 26. Galang, C. K., Der, C. J., and Hauser, C. A. Oncogenic Ras can induce transcriptional activation through a variety of promoter elements, including tandem c-Ets-2 binding sites. *Oncogene*, **9**: 2913–2921, 1994.
 27. Gutman, A., and Wasylyk, B. The *collagenase* gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J.*, **9**: 2241–2246, 1990.
 28. Wasylyk, C., Gutman, A., Nicholson, R., and Wasylyk, B. c-ets oncoprotein activates the *stromelysin* promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO J.*, **10**: 1127–1134, 1991.
 29. Pankov, R., Umezawa, A., Maki, R., Der, C. J., Hauser, C. A., and Oshima, R. G. Oncogene activation of human *keratin 18* transcription via the Ras signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 873–877, 1994.
 30. Stacey, K. J., Fowles, L. F., Colman, M. S., Ostrowski, M. C., and Hume, D. A. Regulation of urokinase-type plasminogen activator gene transcription by macrophage colony-stimulating factor. *Mol. Cell. Biol.*, **15**: 3430–3441, 1995.
 31. Mackie, E. J., Tucker, R. P., Halfter, W., Chiquet-Ehrismann, R., and Epperlein, H. H. The distribution of *tenascin* coincides with pathways of neural crest cell migration. *Development (Camb.)*, **102**: 237–250, 1988.
 32. Tucker, R. P., and McKay, S. E. The expression of *tenascin* by neural crest cells and glia. *Development (Camb.)*, **112**: 1031–1039, 1991.
 33. Pepper, M. S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Orci, L., and Montesano, R. Hepatocyte growth factor increases urokinase-type plasminogen activator (*u-PA*) and *u-PA* receptor expression in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **267**: 20493–20496, 1992.
 34. Pepper, M. S., Belin, D., Montesano, R., Orci, L., and Vassalli, J. D. Transforming growth factor- β 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells *in vitro*. *J. Cell Biol.*, **111**: 743–755, 1990.
 35. Dhordain, P., Dewitte, F., Desbiens, X., Stéhelin, D., and Duterque-Coquillaud, M. Mesodermal expression of the chicken *erg* gene associated with precartilaginous condensation and cartilage differentiation. *Mech. Dev.*, **50**: 17–28, 1995.
 36. Yang, B. S., Hauser, C. A., Henkel, G., Colman, M. S., VanBeveren, C., Stacey, K. J., Hume, D. A., Maki, R. A., and Ostrowski, M. C. Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. *Mol. Cell Biol.*, **16**: 538–547, 1996.
 37. Rorth, P., Nerlov, C., Blasi, F., and Johnsen, M. Transcription factor PEA3 participates in the induction of urokinase plasminogen activator transcription in murine keratinocytes stimulated with epidermal growth factor or phorbol-ester. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 5009–5017, 1990.
 38. Schneikert, J., Peterziel, H., Defossez, P. A., Klocker, H., de Launoit, Y., and Bato, A. C. Androgen receptor-Ets protein interaction: a novel mechanism for steroid hormone mediated down modulation of matrix-metalloproteinase expression. *J. Biol. Chem.*, **271**: 23907–23913, 1996.
 39. Wasylyk, C., Maira, S.-M., Sobieszczuk, P., and Wasylyk, B. Reversion of Ras transformed cells by Ets transdominant mutants. *Oncogene*, **9**: 3665–3673, 1994.
 40. Plaza, S., Grevin, D., MacLeod, K., Stéhelin, D., and Saule, S. Pax-QNR/Pax-6, a paired- and Homeobox-containing protein, recognizes Ets binding sites and can alter the transactivating properties of Ets transcription factors. *Gene Expression*, **4**: 43–52, 1994.
 41. Boccaccio, C., Gaudino, G., Gambarotta, G., Galimi, F., and Comoglio, P. M. Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression is inducible and is part of the delayed-early response to HGF. *J. Biol. Chem.*, **269**: 12846–12851, 1994.
 42. Gilles, F., Raes, M. B., Stéhelin, D., Vandenbunder, B., and Fafeur, V. The *c-ets-1* proto-oncogene is a new early-response gene differentially regulated by cytokines and growth factors in human fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, **222**: 370–378, 1996.
 43. Behrens, J., Mareel, M. M., Van Roy, F., and Birchmeier, W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of ovomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.*, **108**: 2435–2447, 1989.
 44. Laudet, V., Niel, C., Duterque-Coquillaud, M., Leprince, D., and Stéhelin, D. Evolution of the *ets* gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **190**: 8–14, 1993.
 45. Thery, C., Sharpe, M. J., Stern, C. D., and Gherardi, E. Expression of *HGF/SF*, *HGFI/MSP* and *c-met* suggests new functions during chick development. *Dev. Genet.*, **17**: 90–101, 1995.
 46. Andermacher, E., Surani, M. A., and Gherardi, E. Co-expression of the HGF/SF and *c-met* genes during early mouse embryogenesis precedes reciprocal expression in adjacent tissues during organogenesis. *Dev. Genet.*, **18**: 254–266, 1996.
 47. Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., and Birchmeier, C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature (Lond.)*, **376**: 768–771, 1995.
 48. Quéva, C., Ness, S. A., Grässer, F. A., Graf, T., Vandenbunder, B., and Stéhelin, D. Expression patterns of *c-myb* and of *v-myb* induced myeloid-1 (*mim-1*) gene during the development of the chick embryo. *Development (Camb.)*, **114**: 125–133, 1992.
 49. Chen, J. H. Cloning, sequencing, and expression of mouse *c-ets-1* cDNA in baculovirus expression system. *Oncogene Res.*, **5**: 277–285, 1990.
 50. Belin, D., Vassalli, J. D., Combépine, C., Godeau, F., Nagamine, Y., Reich, E., Kocher, H. P., and Duvoisin, R. M. Cloning, nucleotide sequencing and expression of cDNAs encoding mouse urokinase-type plasminogen activator. *Eur. J. Biochem.*, **148**: 225–232, 1985.
 51. Henriot, P., Rousseau, G. G., and Eeckout, Y. Cloning and sequencing of mouse *collagenase* cDNA. *FEBS Lett.*, **310**: 175–178, 1992.
 52. Gégonne, A., Bosselut, R., Bailly, R. A., and Ghysdael, J. Synergistic activation of the HTLV1 LTR Ets-responsive region by transcription factors Ets1 and Sp1. *EMBO J.*, **12**: 1169–1178, 1993.
 53. Desbiens, X., Quéva, C., Jaffredo, T., Stéhelin, D., and Vandenbunder, B. The relationship between cell proliferation and the transcription of the nuclear oncogenes *c-myc*, *c-myb* and *c-ets-1* during feather morphogenesis in the chick embryo. *Development (Camb.)*, **111**: 699–713, 1991.
 54. Erickson, C. A., and Perris, R. The role of cell-cell and cell-matrix interactions in the morphogenesis of the neural crest. *Dev. Biol.*, **159**: 60–74, 1993.

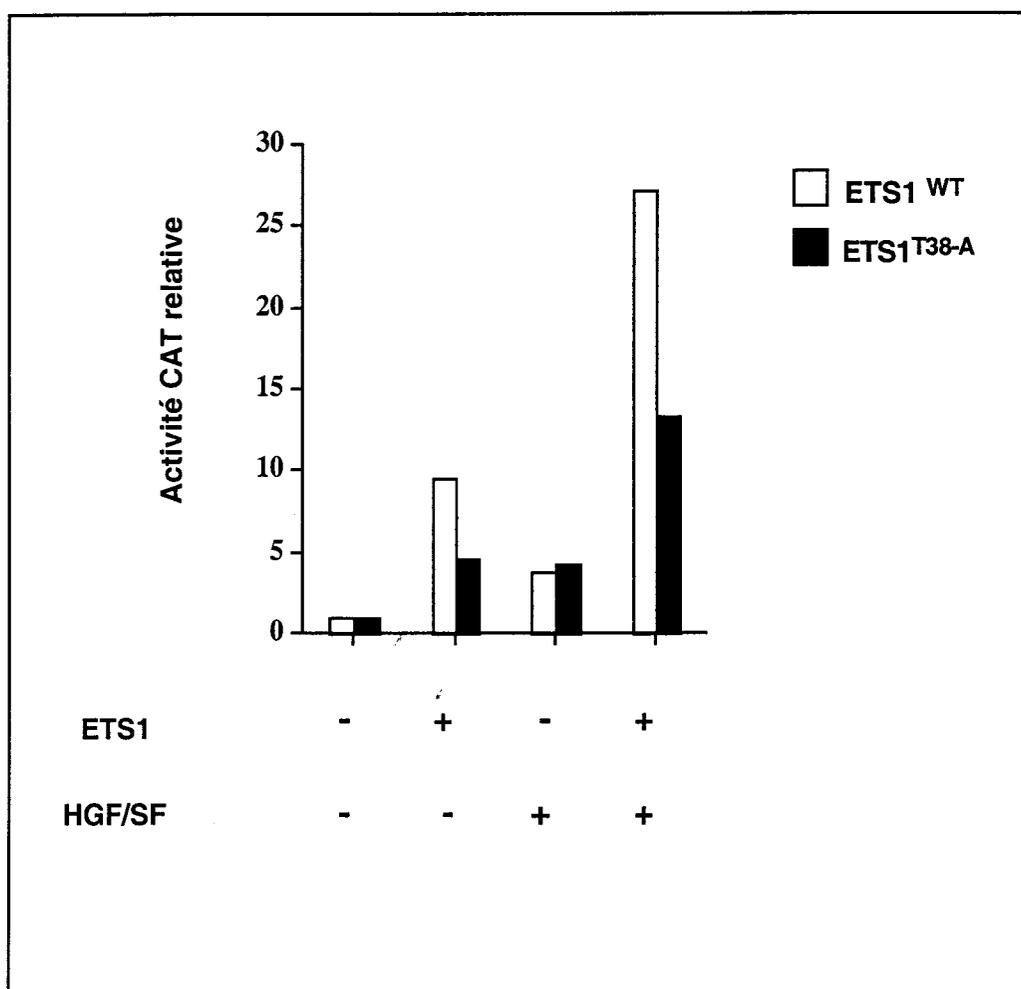


Figure 14 : L'HGF/SF stimule l'activité transcriptionnelle de ETS1 via son résidu thréonine 38. Les cellules MDCK ont été co-transfectées transitoirement par 0,5 µg/ml de gène indicateur EBS/AP1-CAT et 1 µg/ml de vecteur d'expression vide, exprimant ETS1 ou ETS1^{T38-A}. Le jour suivant, les cellules ont été stimulées par 10 ng/ml d'HGF/SF, et l'activité CAT a été mesurée 24 h plus tard.

III. Résultats complémentaires : L'HGF/SF et RAS activent le potentiel transactivateur de ETS1 via le résidu thréonine 38

Nos résultats démontrent que l'HGF/SF et RAS activent efficacement la transcription, via des éléments de réponse de type EBS/AP1 ou EBS/EBS, mais pas via des éléments EBS/SP1. Nous montrons également que l'HGF/SF et RAS sont capables de potentialiser la transactivation induite par ETS1 sur ces mêmes sites, suggérant que les voies en aval de RAS, activées par l'HGF/SF, régulent positivement l'activité transcriptionnelle de ETS1.

En parallèle de ces résultats, les mécanismes de régulation de l'activité transcriptionnelle de ETS1 via RAS, commençaient à être élucidés. Ainsi, il apparaissait que l'activation de RAS pouvait induire la phosphorylation de POINTED P2, ETS2 ou ETS1, sur un résidu thréonine situé dans un site putatif de phosphorylation par les MAPK (PLLTP), conservé sur les trois facteurs de transcription. De plus, ce résidu semblait nécessaire à la potentialisation de activité transactivatrice induite par RAS sur ces facteurs (O'Neill et al., 1994; Yang et al., 1996).

Sur ETS1, le résidu thréonine 38 est situé dans le site putatif de phosphorylation par les MAPK (PLL^{T38P}). De façon à déterminer l'implication de ce résidu, suite à l'activation de ETS1 par l'HGF/SF, nous avons réalisé un mutant de ETS1 dont la thréonine 38 a été remplacée par un résidu alanine non phosphorylable. Des expériences de transfection transitoire, de la forme sauvage ou muté de ETS1, démontrent que la protéine ETS1^{T38→A} active la transcription, à partir des éléments EBS/AP1, moins efficacement que la protéine ETS1 sauvage. De plus, alors que la stimulation par l'HGF/SF potentialise l'effet transactivateur de ETS1 sauvage, l'HGF/SF n'a qu'un effet additif avec ETS1^{T38→A} (Figure 14). Des résultats similaires ont été obtenus par co-transfection d'une forme activée de RAS et ETS1 sauvage ou mutée (résultats non présentés).

Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle ETS1 appartiendrait à la signalisation de l'HGF/SF ; l'HGF/SF induirait l'activation de RAS conduisant à l'activation du potentiel transactivateur de ETS1 par phosphorylation d'un site MAPK putatif PLLTP.

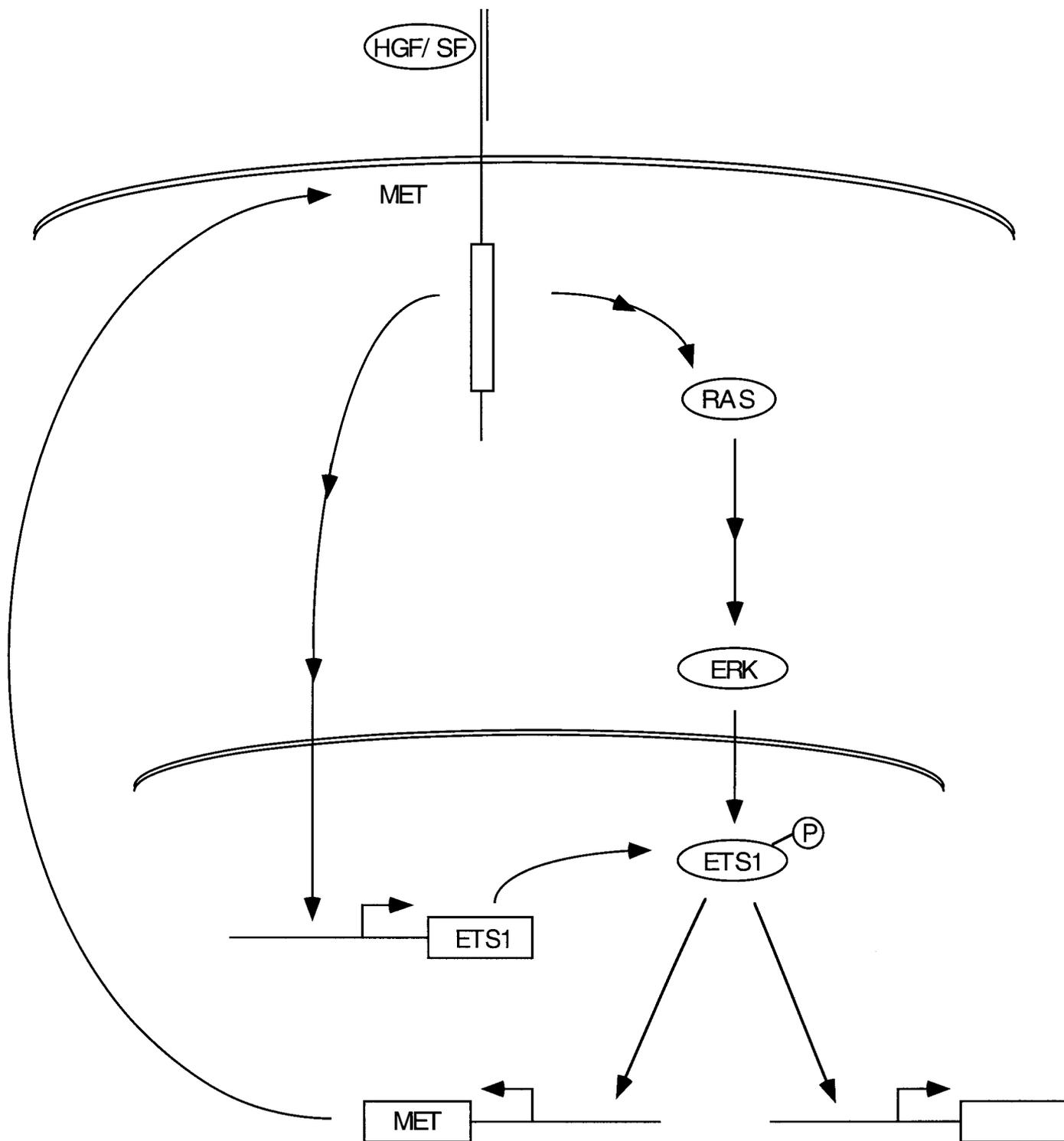


Figure 15: L'HGF/SF induit l'augmentation de l'activité et de l'expression de ETS1. L'activation du facteur de transcription favorise l'expression de gènes dont celui codant MET.

IV. Discussion

A. ETS1, en aval ou en amont de MET ?

L'HGF/SF est capable d'activer le potentiel transactivateur de ETS1 et induit l'augmentation de son expression. Il semble donc que ETS1 soit une cible de MET.

Il est possible de développer un autre point de vue, où MET serait une cible du facteur de transcription ETS1. Ainsi, l'équipe de P. Comoglio a montré qu'un fragment du promoteur du gène de MET, nécessaire à la transactivation d'un gène indicateur, contient de nombreux motifs de reconnaissance des facteurs de transcription de la famille ETS. De plus, ETS1 est capable de transactiver efficacement ce fragment du promoteur. La régulation potentielle du promoteur de MET, par des membres de la famille ETS, a été confirmée par la transfection stable de ETS1 dans les cellules épithéliales MPL (cellules épithéliales murines issues du foie). En effet, la surexpression de ETS1 induit une augmentation de l'expression du récepteur MET (Gambarotta et al., 1996).

En tenant compte de ces différents point de vue, il est possible que ETS1 soit impliqué à plusieurs niveaux : l'HGF/SF active rapidement le potentiel transactivateur de ETS1, via l'activation de RAS, après quelques heures de stimulation, l'activation de MET permet également l'augmentation de l'expression de ETS1. Ces deux effets favoriseraient l'expression de gènes cibles de ETS1, comme des protéases, ou le récepteur MET; les protéases favoriseraient la motilité par la dégradation de la matrice extracellulaire et l'expression du récepteur augmenterait la sensibilité des cellules à l'HGF/SF (Figure 15).

La surexpression de ETS1 dans les cellules épithéliales MPL provoque également l'obtention d'un phénotype dissocié. Les auteurs concluent que ce phénotype est dû à l'augmentation de l'expression de MET (Gambarotta et al., 1996). Cependant, des questions restent ouvertes. En effet, dans ces expériences l'état d'activation du récepteur MET n'a pas été évalué. Or, une augmentation de l'expression du récepteur ne signifie pas une augmentation de son activité, qui est nécessaire pour l'obtention des réponses biologiques. Ainsi, on peut imaginer que l'augmentation de l'expression d'autres gènes par ETS1 soit également responsable du phénotype dissocié. Pour répondre à ses questions d'autres approches sont nécessaires, telle que l'utilisation de formes inactivées de ETS1, qui ont notamment permis, dans le laboratoire, la mise en évidence de l'implication des facteurs de transcription ETS, durant d'autres processus.

B. Les cascades ERK et JNK activées par MET régulent différemment les éléments EBS/AP1

Mes résultats ont permis de montrer que le résidu thréonine 38 de ETS1 est impliqué dans la potentialisation de son activité transactivatrice, induite par l'HGF/SF et RAS. Le travail de Réjane Paumelle, en thèse dans le groupe, a largement étayé ces résultats.

En effet, son travail démontre que l'HGF/SF active les MAPK ERK1,2. De plus, ces kinases activées suite à la stimulation par l'HGF/SF sont capables de phosphoryler ETS1 sur la thréonine 38, dans des essais de phosphorylation *in vitro*. D'autre part, les résultats démontrent que l'HGF/SF induit également, probablement via la petite protéine G CDC42 (proche de RAC), l'activation de la kinase JNK qui permet la phosphorylation du facteur de transcription JUN, de la famille AP1.

L'HGF/SF étant capable d'activer des promoteurs constitués de sites EBS/AP1, l'implication de l'activation de ces deux cascades de kinases par l'HGF/SF a été évaluée sur cet élément bipartite. De façon intéressante, les kinases ERK et JNK ne jouent pas le même rôle et leurs effets sont modulés par la densité cellulaire. En effet, ERK activée induit la transactivation à différentes densités cellulaires, mais est plus efficace à faible densité ; mimant ainsi les réponses induites par l'HGF/SF. Par contraste, JNK activée n'a pas d'effet à faible densité et réprime la transactivation à forte densité.

Ces résultats démontrent que l'HGF/SF induit l'activation à la fois de ERK et JNK ; ERK transmettrait la réponse transcriptionnelle induite par l'HGF/SF et JNK inhiberait la réponse à forte densité. L'ensemble des données permet de proposer un mécanisme intracellulaire de diminution de réponse à l'HGF/SF à forte densité (Paumelle et al., manuscrit en préparation).

Deuxième partie : Le site multisubstrat de MET n'est pas requis pour l'activation de la cascade RAS et de la dispersion

I. Introduction

Dans le modèle de signalisation que nous avons mis en place, pour l'activation transcriptionnelle d'élément de réponse EBS/AP1 par l'HGF/SF, la partie du récepteur MET permettant ces activations n'était pas connue.

Les mutations systématiques des résidus tyrosines de la partie intracellulaire de MET ont notamment été réalisées par M. Weidner et ses collaborateurs (Weidner et al., 1995). Leurs résultats démontrent que les tyrosines 14 et 15 jouent un rôle crucial pour l'induction des réponses biologiques. D'autre part, il semble que la tyrosine 16 soit impliquée dans l'induction de la morphogenèse, alors que la tyrosine 2 joue un rôle négatif pour l'activation des réponses (mutation gain de fonction). Les résidus tyrosines 14 et 15 sont capables de recruter de nombreuses protéines cytoplasmiques, potentiellement capables d'activer des voies de signalisation dont la voie RAS-ERK. En revanche, pour les tyrosines 2 et 16, leur implication dans l'activation de voies de signalisation n'est pas déterminée.

Dans ce contexte, il semblait intéressant de mesurer la contribution des résidus tyrosines de MET, non plus sur la dispersion ou la morphogenèse, mais sur les réponses transcriptionnelles induites sur les éléments EBS/AP1. En effet, dans nos tests de transactivation, la réponse ne résulte pas, a priori, de l'intégration de nombreuses voies de signalisation, mais est plus spécifiquement dépendante de RAS. D'autre part, les tests de transactivation offrent de bonnes possibilités de quantification des réponses.

II. Publication 2

Titre : The multisubstrate docking site of the MET receptor is dispensable for MET-mediated RAS signaling cell scattering.

The Multisubstrate Docking Site of the MET Receptor Is Dispensable for MET-mediated RAS Signaling and Cell Scattering

David Tulasne,* Réjane Paumelle,* K. Michael Weidner,[†] Bernard Vandembunder,* and Véronique Fafeur*[‡]

*Centre National de la Recherche Scientifique EP 560, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, 59021 Lille, France; and [†]Department of Therapeutics/Biotechnology, Boehringer Mannheim, 82372 Penzberg, Germany

Submitted June 19, 1998; Accepted December 8, 1998
Monitoring Editor: Carl-Henrik Heldin

The scatter factor/hepatocyte growth factor regulates scattering and morphogenesis of epithelial cells through activation of the MET tyrosine kinase receptor. In particular, the noncatalytic C-terminal tail of MET contains two autophosphorylation tyrosine residues, which form a multisubstrate-binding site for several cytoplasmic effectors and are thought to be essential for signal transduction. We show here that a MET receptor mutated on the four C-terminal tyrosine residues, Y1311F, Y1347F, Y1354F, and Y1363F, can induce efficiently a transcriptional response and cell scattering, whereas it cannot induce cell morphogenesis. Although the mutated receptor had lost its ability to recruit and/or activate known signaling molecules, such as GRB2, SHC, GAB1, and PI3K, by using a sensitive association-kinase assay we found that the mutated receptor can still associate and phosphorylate a ~250-kDa protein. By further examining signal transduction mediated by the mutated MET receptor, we established that it can transmit efficient RAS signaling and that cell scattering by the mutated MET receptor could be inhibited by a pharmacological inhibitor of the MEK-ERK (MAP kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase) pathway. We propose that signal transduction by autophosphorylation of the C-terminal tyrosine residues is not the sole mechanism by which the activated MET receptor can transmit RAS signaling and cell scattering.

INTRODUCTION

The scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) is a mesenchymal cytokine that acts predominantly on cells of epithelial origin. According to its original identifications, SF/HGF promotes the scattering and/or growth of various epithelial cells (Nakamura *et al.*, 1984, 1989; Stoker *et al.*, 1987; Naldini *et al.*, 1991). The scattering response comprises initial cell dissociation that involves cytoskeletal reorganization and loss of intercellular junctions, followed by active migration. In addition, SF/HGF has been shown to induce formation of branches and tubules, suggesting that it plays a role during epithelial morphogenesis (Monte-

sano *et al.*, 1991; Tsafarty *et al.*, 1992). The expression patterns in combination with the pleiotropic properties of SF/HGF support the idea that this ligand is an important mediator of the interaction between the epithelial and stromal compartments of various tissues during normal and pathological development (reviewed in Birchmeier and Birchmeier, 1993; Matsumoto and Nakamura, 1996).

A high-affinity receptor for SF/HGF has been identified as the MET tyrosine kinase receptor (Park *et al.*, 1987; Giordano *et al.*, 1989; Bottaro *et al.*, 1991; Naldini *et al.*, 1991). It is a 190-kDa transmembrane protein, composed of an α subunit of 45 kDa disulfide linked to a β subunit of 145 kDa, which contains the catalytic domain. Upon ligand binding and subsequent dimerization of MET, several tyrosine residues in the intra-

[‡] Corresponding author. E-mail address: vfafeur@infobiogen.fr.

cellular region of the β subunit become phosphorylated (Ponzetto *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994): Y1232, Y1233, Y1347, and Y1354, or Y8, Y9, Y14, and Y15 when intracellular tyrosine residues of mouse MET were numbered 1–16 (Weidner *et al.*, 1995). Within the tyrosine kinase domain, Y8 and Y9 are the major autophosphorylation sites, and their mutations abolish the biological activity (Longati *et al.*, 1994). Outside the kinase domain, the two autophosphorylation sites in the C-terminal region, Y14 and Y15, are responsible for the binding of various proteins known to interact with MET, which include GRB2, SRC, PI3K, PLC γ , SHC, SHP-2, GAB1, and most likely STAT3 (Ponzetto *et al.*, 1994; Pelicci *et al.*, 1995; Fournier *et al.*, 1996; Weidner *et al.*, 1996; Nguyen *et al.*, 1997; Boccaccio *et al.*, 1998). More precisely, it was found that GRB2 is only recruited by Y15, whereas seven distinct proteins (SRC, PI3K, PLC γ , SHC, SHP-2, GAB1, and STAT3) are recruited by both Y14 and Y15. All these signaling molecules bind phosphorylated tyrosine residues via their respective Src homology 2 domains, except for GAB1, which binds via a novel MET-binding domain (Weidner *et al.*, 1996). Taken together, this points to an interesting characteristic of MET: a short sequence located in the C-terminal tail and containing two tyrosine residues (Y14 and Y15), is alone responsible for the recognition of several cytoplasmic effectors.

This multiplicity of substrates for the same region of a receptor questions the sequential recognition and relative contribution of these substrates to the pleiotropic activities of MET in epithelial cells, which include cell motility and morphogenesis. To unravel this issue, several groups used a chimeric receptor strategy. They established Madin–Darby canine kidney (MDCK) cell lines expressing mutated MET chimeric receptors in which tyrosine residues have been substituted to phenylalanine to prevent their phosphorylation. Using these cell lines, the ability of mutated receptors to promote cell scattering (motile response) and branching morphogenesis in collagen gels (morphogenesis response) was determined. Single mutations of Y15 led to controversial results on both cell motility and morphogenesis (Ponzetto *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1994; Weidner *et al.*, 1995). For example, mutation of this tyrosine residue abolished cell motility in one study (Zhu *et al.*, 1994) but had no effect in another (Weidner *et al.*, 1995). Double mutations of both Y14 and Y15 consistently had an effect on cell motility, resulting in either abolition (Ponzetto *et al.*, 1994) or reduction of cell motility (Weidner *et al.*, 1995). In addition, other tyrosine residues were found to contribute to these biological activities. For example, Y16, like Y15, could reduce cell morphogenesis, and mutation of all C-terminal tyrosine residues, Y13–16, could reduce but not abolish cell motility (Weidner *et al.*, 1995).

Using transactivation assays, we recently demonstrated that SF/HGF can induce a transcriptional response in MDCK epithelial cells; this effect involves RAS and ETS1 and results in the activation of specific promoters containing ETS/AP1-binding sites (Fafeur *et al.*, 1997). To establish the relative contribution of the C-terminal tyrosine residues of MET in transmitting transcriptional activation, we cotransfected different reporter genes containing ETS/AP1-binding sites with TRK–MET hybrid receptors, mutated or not on various tyrosine residues. This led us to characterize further in stable cell lines the biological effects mediated by a TRK–MET receptor in which the four C-terminal tyrosine residues (Y13–16) of MET were mutated. Our results suggest that all signaling and biological activities of the activated MET receptor are not mediated by the C-terminal tyrosine residues.

MATERIALS AND METHODS

Cytokines, Drug, and Cell Cultures

Human recombinant forms of SF/HGF and β -nerve growth factor (β -NGF) were purchased from R & D Systems (Minneapolis, MN). PD98059, a specific inhibitor of MEK1, was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). MDCK epithelial cells (kindly provided by Dr. J. Jouanneau, Ecole Normale Supérieure, Paris, France) and NIH-3T3 fibroblasts were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 10% FCS and antibiotics at 37°C.

Plasmids

The various expression vectors of TRK–MET were previously described (Weidner *et al.*, 1995). Briefly, the cDNA encoding the extracellular domain of the human high-affinity NGF receptor (TRK) was fused to the sequence encoding the transmembrane and cytoplasmic region of mouse MET. Tyrosine-to-phenylalanine substitutions were introduced into the TRK–MET cDNA by site-directed mutagenesis using mismatched oligonucleotide primers.

The vector expressing the dominant negative form of RAS (pRSV-RAS^{N17}) was provided by Dr. S. Rayter (Sugen, Redwood City, CA). The expression vector expressing the dominant negative form of CDC42 (pMT90-CDC42^{N17}) was provided by Dr. P. Chavrier (Center d'Immunologie, Marseille, France).

The reporter vectors used were as follows: Py-Luc contains three tandem copies of a polyoma virus enhancer–derived sequence with ETS/AP1-binding sites linked to the thymidine kinase promoter and drives the luciferase reporter gene (Wasylyk *et al.*, 1990); urokinase plasminogen activator (uPA)-Luc contains a 90-bp *Hae*III fragment of the mouse uPA promoter (–2446, –2356) linked to the uPA proximal promoter (–114, +398) and drives the luciferase reporter gene (Stacey *et al.*, 1995); collagenase-Luc contains the (–517, +63) region of the human collagenase 1 promoter sequence linked to the luciferase gene (Schneikert *et al.*, 1996).

Antibodies

Rabbit polyclonal antibodies anti-ERK2 and anti-MET SP260 (directed against the C-terminal tail of mouse c-MET) were purchased from Santa-Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Rabbit polyclonal antibodies anti-phospho-specific-MAPK (ERK), anti-SHC, and anti-GAB1 were purchased from Biolabs (Northbrook, IL), Transduction Laboratories (Lexington, KY), and Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY), respectively. Mouse monoclonal antibodies 4G10 anti-phosphotyrosine and anti-GRB2 were purchased from Upstate Bio-

technology and Transduction Laboratories, respectively. Alkaline phosphatase conjugates of antibodies directed against rabbit and mouse immunoglobulin G were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

Transactivation Assays

The transactivation assays were performed as described previously with minor modifications (Fafeur *et al.*, 1997). Briefly, 15×10^3 MDCK cells were cultured in 12-well plates and were transiently transfected using a lipofection method. Cells were incubated with a mixture of DNA (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and LipofectAMINE (Life Technologies; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). In each experiment, plates were incubated with the same total amount of plasmid DNA, completed as necessary with the corresponding empty expression vector. The following day, cells were stimulated with 10 ng/ml SF/HGF or 100 ng/ml NGF. Controls consisted of unstimulated cells. Twenty-four hours later, cells were disrupted in reporter lysis buffer (Promega, Madison, WI). The supernatant was assayed for protein content and processed for luciferase assays. The value obtained was normalized to the protein content of the cell extract. Fold activation is the ratio from each luciferase value, relative to the luciferase activity from the reporter gene with empty expression vector. Triplicate samples were performed in each experiment, and SDs are shown. Each experiment was repeated at least twice with independent plasmid preparations to assess reproducibility.

Stable Transfections

MDCK cells ($6 \times 10^5/100\text{-mm}$ dish) were cultured for 24 h and then transfected by lipofection with 10 μg of expression vectors, either empty (pBAT), wild-type (WT) TRK-MET, or Y13-16F TRK-MET, and 1 μg of pSV2-neo. For each vector, 20 clones from two independent transfections were selected after culture in neomycin-selective medium (0.8 mg/ml G418/DMEM and 10% FCS). The clones were analyzed by Western blotting for expression of TRK-MET hybrid receptors.

Metabolic Labeling and Immunoprecipitation

For metabolic labeling, MDCK cells (1.5×10^5 cells/100-mm dish) were cultured for 2-3 d in DMEM and 10% FCS. The media were replaced for 1 h by methionine- and cysteine-free modified Eagle's medium (MEM, Met⁻, Cys⁻; Life Technologies). During the last 2 h of incubation cells were cultured in fresh MEM, Met⁻, Cys⁻, with 250 $\mu\text{Ci}/3$ ml of L-[³⁵S]methionine and cysteine (Tran³⁵S-Label, 1066 Ci/mmol; ICN, Costa Mesa, CA). At the end of the experiments, cells were lysed and processed for immunoprecipitation as described (Gilles *et al.*, 1996). Briefly, identical trichloroacetic acid-precipitable counts of proteins were immunoprecipitated and separated onto 10% SDS-polyacrylamide gels. Gels were fixed and treated with DMSO containing 20% 2,5-diphenyloxazole for autoradiographic enhancement and exposed for autoradiography using Hyperfilm-MP (Amersham International, Little Chalfont, England).

Immunoprecipitation and Western Blotting

MDCK cells (10^6 cells/100-mm dish) were cultured 1 d in DMEM and 10% FCS and grown for a further 24 h in serum-free MEM. Cells were lysed in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 50 mM NaCl, 5 mM EGTA, and 1% vol/vol Triton X-100) containing freshly added protease and phosphatase inhibitors (1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 1 μM leupeptin, 2 μM aprotinin, 50 mM sodium fluoride, and 4 mM sodium orthovanadate). Lysates were clarified by centrifugation at 4°C, and protein concentration was determined by Bio-Rad (Hercules, CA) protein assay. Appropriate antibodies were incubated with total cell lysates overnight at 4°C, and antibodies were then adsorbed on protein A-Sepharose for 1 h at 4°C. Immune complexes were washed four times with ice-cold lysis buffer, eluted, and denatured by heating for 3 min at 95°C in reducing Laemmli

buffer. Immunoprecipitates (or cell lysates for direct analysis by Western blotting) were separated on SDS-polyacrylamide gels. For immunoblot analysis, proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride filters (Millipore, Bedford, MA). Filters were incubated 1 h at 22°C in blocking buffer (0.2% wt/vol casein and 0.1% vol/vol Tween 20 dissolved in PBS) and probed 1 h at 22°C with specific antibodies diluted in blocking buffer. After extensive washing, immune complexes were detected with species-specific secondary antiserum conjugated with alkaline phosphatase followed by an enhanced chemiluminescence detection system (Aurora, ICN). For membrane reprobing, filters were incubated in stripping buffer (0.2 M glycine, pH 2.2, 0.1% SDS, and 1% Tween 20); after extensive washing, filters were incubated in blocking buffer and reprobed with specific antibodies.

Association-Kinase Assay

This assay was performed either on stable transfectants or on transiently transfected cells. MDCK cells (10^6 cells/100-mm dish) were cultured for 24 h in DMEM and 10% FCS and transiently transfected or not using the lipofection method. The cells were then grown for 24 h in DMEM and 0.5% FCS. The cells were then stimulated for 10 min with 100 ng/ml NGF or 10 ng/ml SF/HGF. After growth factor treatment, cells were disrupted and immunoprecipitated with the anti-MET antibody in lysis buffer, as described above. Immune complexes and associated proteins were washed four times with ice-cold lysis buffer and once in kinase buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 12.5 mM MgCl₂). *In vitro* kinase assays were performed at 37°C in 50 μl of kinase buffer containing 10 μCi [γ -³²P]ATP (4000 Ci/mmol) and 10 μM cold ATP for 15 min. Phosphorylated proteins were then resolved on SDS-polyacrylamide gels and visualized by autoradiography.

Assays for Cell Scattering

Scattering from cell islets was performed as follows. MDCK cells (6×10^4 cells per well) were seeded onto six-well plates and cultured for 24 h in DMEM and 10% FCS, with or without 10 ng/ml SF/HGF or 100 ng/ml NGF. The cell scattering from circular wounds was performed essentially as described previously (Klein-Soyer *et al.*, 1986). Briefly, MDCK cells were seeded onto 12-well plates and grown to confluence in DMEM and 10% FCS. A circular wound was made in the center of the well using a calibrated Whatman (Clifton, NJ) 3 MM paper disk (5 mm in diameter). MDCK cells were cultured 4 d in DMEM and 10% FCS with or without 10 ng/ml SF/HGF or 100 ng/ml NGF. At the end of the experiments, cells were fixed and stained (Diff-Quik; Dade AG, Düringen, Switzerland), and their morphologies were examined by light microscopy.

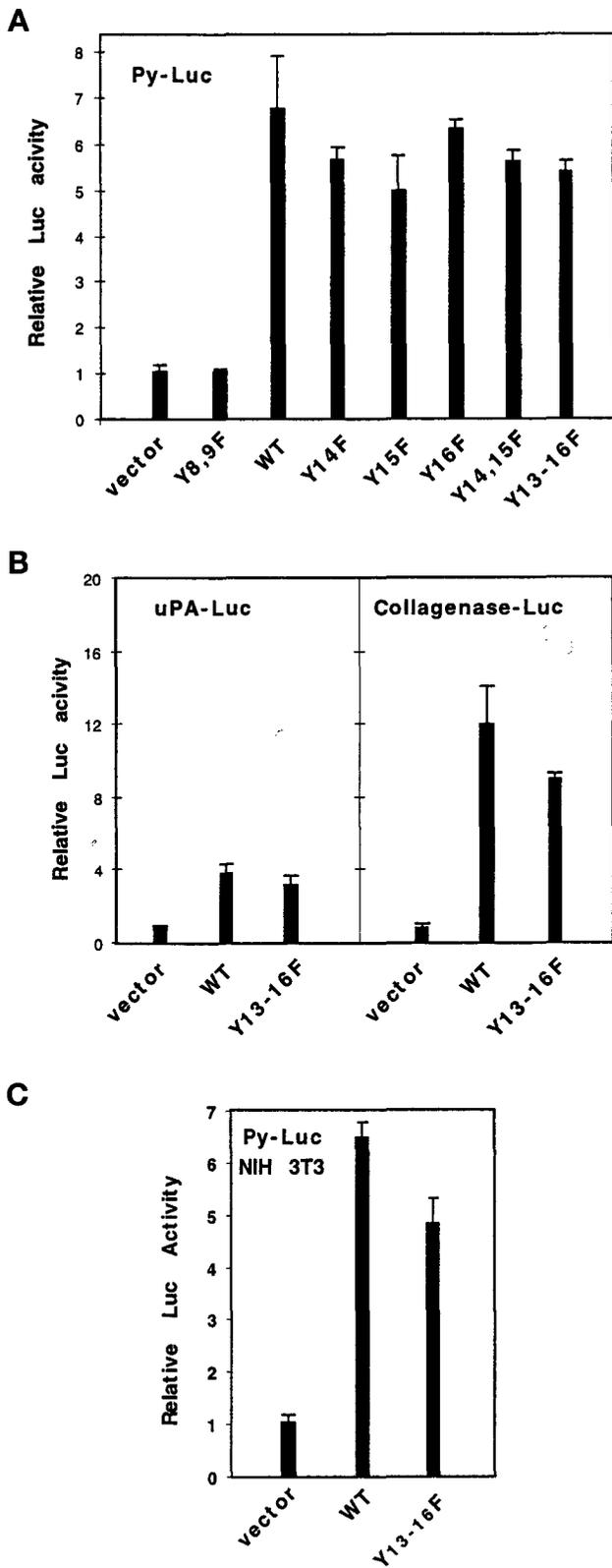
Assays for Cell Morphogenesis

Formation of cellular networks on Matrigel gels was performed as follows. MDCK cells (4×10^4 cells per well) were plated on a layer of 300 μl of Matrigel (Becton Dickinson, San Jose, CA) in 24-well plates in DMEM and 10% FCS. The next day, cultures were stimulated with or without 10 ng/ml SF/HGF or 100 ng/ml NGF for 24 h. At the end of the experiments, cells were stained 20 min at 37°C with neutral red (0.5% wt/vol), and fixed with 4% paraformaldehyde, and their morphologies were examined by light microscopy.

RESULTS

The Y13-16 C-Terminal Tyrosine Residues of MET Are Not Required for Efficient Transcriptional Activation

We transiently cotransfected MDCK epithelial cells with both the TRK-MET hybrid receptor mutated on



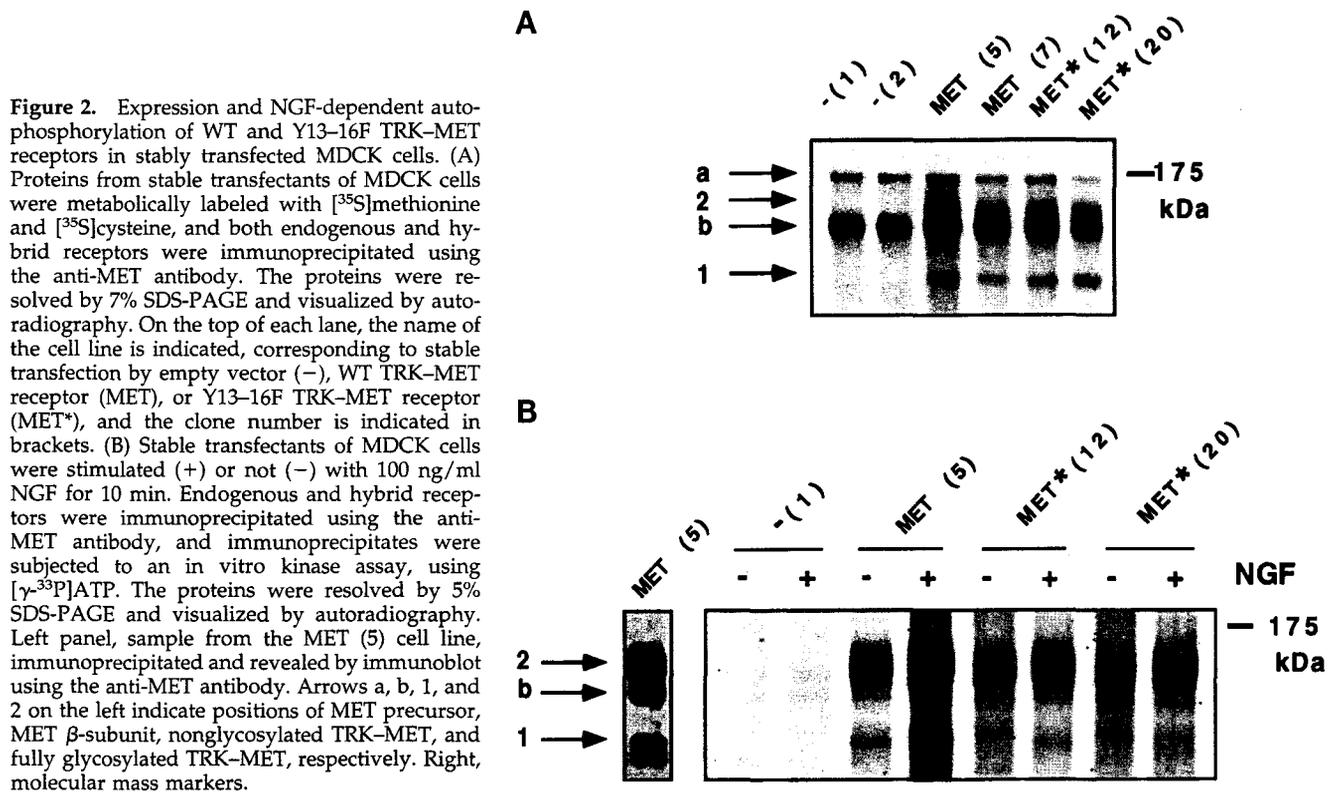
specific tyrosine residues and the Py-Luc reporter, which contains an ETS/AP1-responsive element. The TRK-MET hybrid receptor consists of the ligand-binding domain of the NGF receptor (TRK) fused to the kinase domain of MET. This hybrid receptor has been shown to mediate MET-specific signals in epithelial cells in response to NGF (Weidner *et al.*, 1993, 1995).

We found that TRK-MET mutated on tyrosine residues 8 and 9 (Y8,9F) of the tyrosine kinase region was unable to induce transactivation of the Py-Luc reporter (Figure 1A). These results showed that the tyrosine kinase activity of the MET receptor is essential for inducing this transcriptional response.

By contrast, mutations of tyrosine residues of the C-terminal tail of MET did not abrogate its ability to transmit transactivation. As shown in Figure 1A, single (Y13, Y14, Y15, or Y16), double (Y14-15), or complete Y to F (Y13-16) mutations of C-terminal tyrosine residues of the receptor mediated a transcriptional response, like the WT receptor. Similar results were obtained using uPA- or collagenase-Luc reporters (Figure 1B), in which functional ETS/AP1 have been identified (Gutman and Waslyk, 1990; Rorth *et al.*, 1990; Fafeur *et al.*, 1997). In all of these transactivation assays, a decrease in transcriptional activation in cells transfected by Y13-16F TRK-MET versus WT TRK-MET receptors was never >30% and was not systematically observed. In addition, dose-response experiments were performed using increasing concentrations of expression vectors for WT and Y13-16F TRK-MET. Each concentration was found to be effective: optimal induction was obtained with 200 ng/ml expression vector for WT or Y13-16F TRK-MET, and higher concentrations (up to 1 μ g/ml) did not decrease transactivation (our unpublished results).

The WT and Y13-16F TRK-MET receptors were also able to induce a transcriptional response in NIH-3T3 cells (Figure 1C). Unlike MDCK cells, NIH-3T3 cells do not respond to SF/HGF in these transactivation assays (our unpublished results). These results demonstrated that the Y13-16F TRK-MET receptor can also transduce a signal leading to the transcriptional

Figure 1. Mutation of the C-terminal tyrosine residues of MET does not abolish its ability to transmit a transcriptional response, involving ETS/AP1-binding sites. (A) MDCK cells were transiently cotransfected with 0.5 μ g/ml Py-Luc reporter and 1 μ g/ml vectors, either empty (vector), or expressing WT TRK-MET receptor (WT) or TRK-MET receptor, mutated on various tyrosine residues (Y-F). The following day, MDCK cells were stimulated with 100 ng/ml NGF, and the luciferase activity was measured 24 h later. (B) MDCK cells were transiently cotransfected with 1 μ g/ml vectors, either empty or expressing WT or Y13-16F TRK-MET receptor, and 0.5 μ g/ml uPA- or collagenase-Luc reporters. Treatment with NGF and measurement of the relative luciferase activity were as described above. (C) NIH-3T3 cells were transiently cotransfected with 1 μ g/ml vectors, either empty or expressing WT or Y13-16F TRK-MET receptor, and 0.5 μ g/ml Py-Luc reporter. Treatment with NGF and measurement of the relative luciferase activity were as described above.



activation of the Py-Luc reporter independently of endogenous functional MET receptors.

Taken together these results demonstrated that a TRK-MET receptor mutated on Y13-16 residues can transmit a transcriptional response, involving activation of promoter elements containing ETS/AP1-binding sites.

The Y13-16F TRK-MET Receptor Can Promote Cell Motility but Fails to Promote Cell Morphogenesis

To investigate whether these sites are required for cell motility and morphogenesis, we have generated stable MDCK cell lines expressing WT and Y13-16F TRK-MET receptor. Stable transfectants of MDCK cells were selected for the expression of the TRK-MET hybrid receptor, and clones, obtained from independent transfections, were further analyzed. Immunoprecipitations were performed using an anti-MET antibody, which recognizes both hybrid TRK-MET and endogenous MET receptors. In nontransfected MDCK cells, immunoprecipitation analysis revealed the presence of the 170-kDa precursor and the 145-kDa β -subunit of the endogenous MET receptor (Figure 2A). In MDCK cells transfected with the TRK-MET receptors, two new bands were detected; an upper band at ~150 kDa and a lower band at ~125 kDa, which correspond to the fully glycosylated and nonglycosylated hybrid

receptors, respectively (Ponzetto *et al.*, 1996) (Figure 2A). After kinase assay, phosphorylation of TRK-MET, but not of endogenous MET, was induced by NGF in all TRK-MET cell lines (Figure 2B).

The motile responses of the stable cell lines were examined in two different assays. First, the cells were seeded at low density, allowing the cells to grow as islets. Addition of SF/HGF for 24 h caused scattering of all cell lines (Figure 3A), whereas addition of NGF caused cell scattering only in TRK-MET cell lines (Figure 3A). Similar results were observed in a wound assay, in which scattering is measured from confluent monolayers. Stable transfectants were grown up to confluence, and circular wounds were performed with a calibrated disk. From this wound, the cells can dissociate, migrate, and proliferate. In the presence of serum, the size of the hole was smaller in SF/HGF-treated cells compared with untreated cells (Figure 3B). In parallel experiments, we established that SF/HGF was unable to induce proliferation of MDCK cells in culture medium containing either low (0.5%) or regular (10%) serum concentration (our unpublished results). In this wound assay, we propose that we primarily demonstrated the scattering effect of SF/HGF from the wound, allowing the loss of cell contact inhibition, leading, as a secondary effect, to an increase in cell proliferation and to the reconstitution of the cell

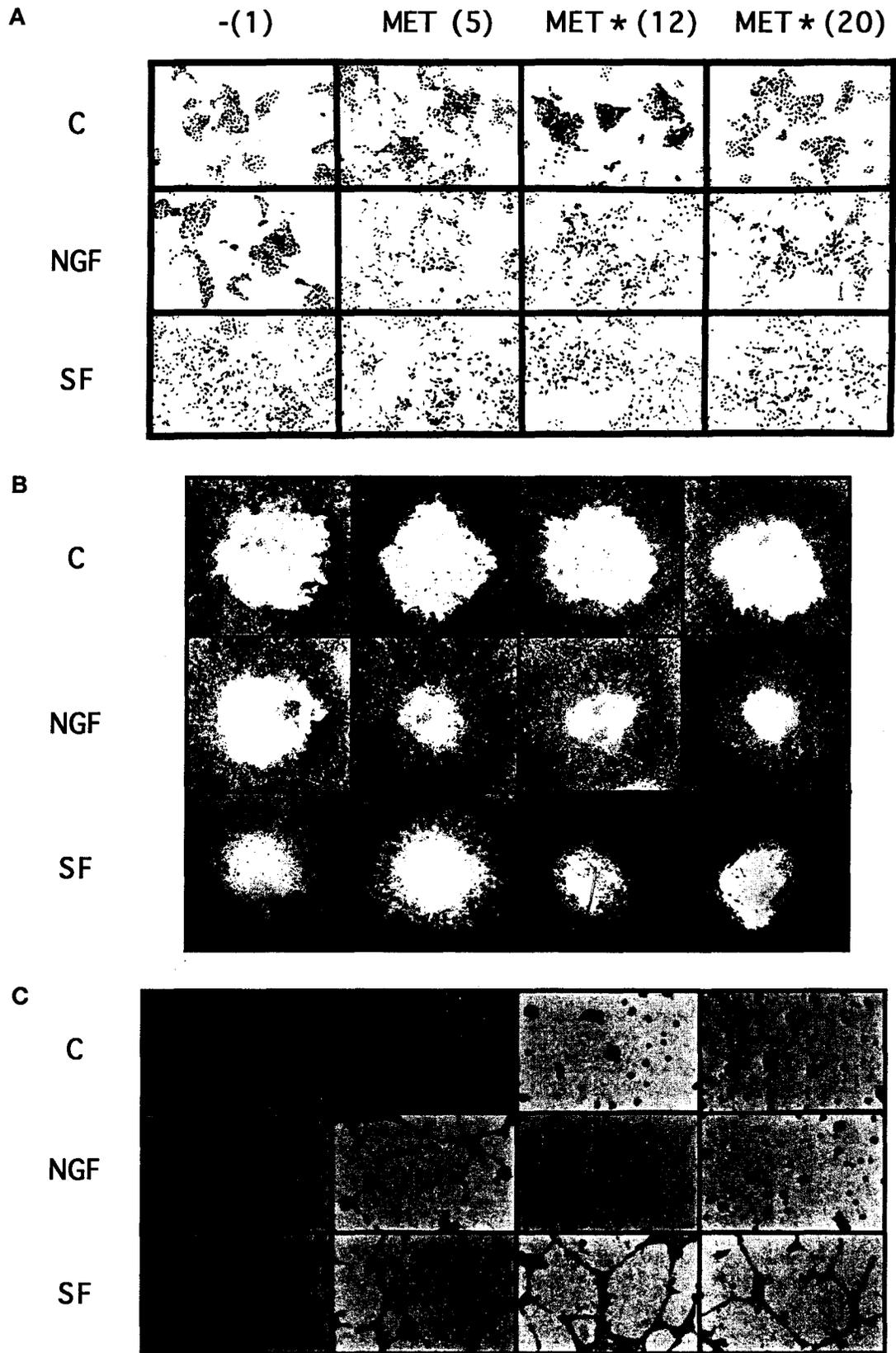


Figure 3.

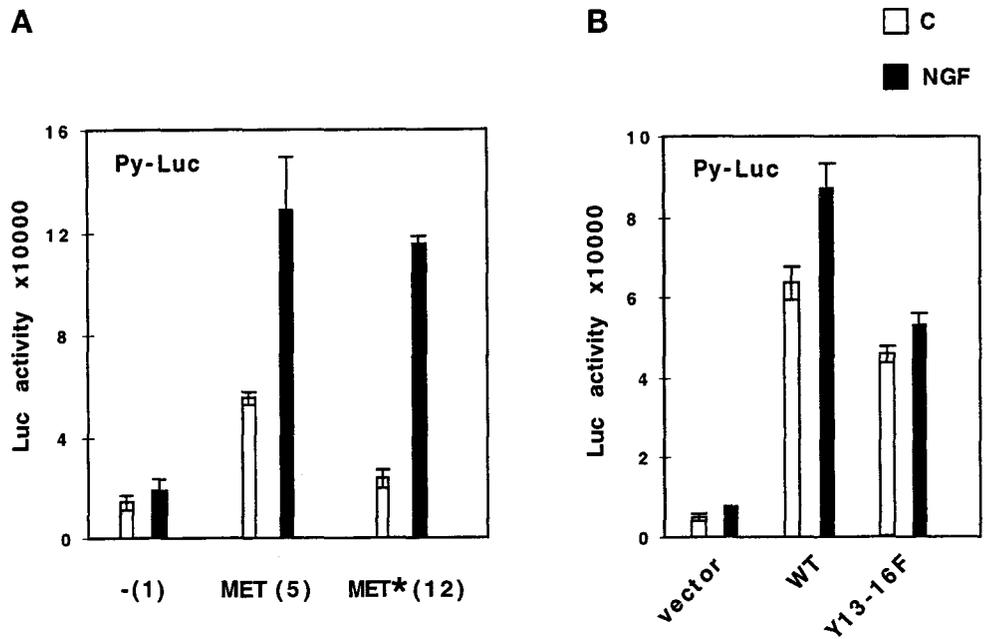


Figure 4. The Y13-16F TRK-MET receptor retains the ability to transactivate the Py-Luc reporter in stable transfectants. (A) Stable transfectants of MDCK cells were transiently transfected with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Py-Luc reporter. The following day, cells were stimulated for 24 h with 100 ng/ml NGF (black bars) or without (white bars), and luciferase activity was measured. (B) MDCK cells were transiently co-transfected with 1 $\mu\text{g/ml}$ vectors, either empty or expressing WT or Y13-16F TRK-MET receptor, and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Py-Luc reporter. The following day, MDCK cells were stimulated with 100 ng/ml NGF, and the luciferase activity was measured 24 h later.

layer. This wound assay also demonstrated that NGF caused scattering in all TRK-MET cell lines (Figure 3B).

The response of TRK-MET cell lines to NGF was different in morphogenesis assays. After seeding on Matrigel gels, small aggregates of cells were obtained within 24 h. The next day, SF/HGF was added for 24 h, and most of the cells became fusiform and propelled extensions, resulting in the formation of a spider web-like network in all stable transfectant MDCK cells (Figure 3C). A similar network formation was obtained with NGF but only in the stable cell line expressing WT TRK-MET (Figure 3C). The absence of morphogenetic effect of NGF on mutated TRK-MET cell lines was confirmed in a collagen gel assay. Stable transfectants were cultured at low density within the collagen gel until spherical cyst formation occurred. SF/HGF was then added for 3 d, resulting in the

formation of branching cords extending from the cysts into the surrounding collagen gel in all stable cell lines. Consistent with previous studies (Weidner *et al.*, 1995), NGF induced a similar morphological effect in stable cell lines expressing WT TRK-MET and was unable to induce this effect in stable cell lines expressing Y13-16F TRK-MET receptor (our unpublished results).

The Y13-16F TRK-MET Receptor Retains the Ability to Induce Transcriptional Activation in Stable Transfectants

The ability of the Y13-16F TRK-MET receptor to transmit a transcriptional response (see Figure 1) was confirmed using transfection of the Py-Luc reporters in stable MDCK clones expressing TRK-MET receptors. Both cell lines expressing WT or mutated TRK-MET receptor, stimulated by NGF, could transmit a transcriptional response (Figure 4A) at a similar level than after stimulation by SF/HGF (also see Figure 7A). It should be noted that in the absence of NGF, the cell line expressing WT TRK-MET showed a higher basal transcriptional activation compared with the control and mutated receptor cell line (Figure 4A). This was consistent with a higher basal scattering and phosphorylation of this WT TRK-MET receptor cell line (Figures 2B and 3A).

The principal difference between stable cell lines and transiently transfected cells was a stronger response to NGF (Figure 4, compare A and B). Transient transfection can result in overexpression of the transfected tyrosine kinase receptors leading to auto-

Figure 3 (facing page). Effect of SF/HGF and NGF on the induction of cell scattering and morphogenesis in stably transfected MDCK cells. (A) Scattering from cell islets. Stable transfectant MDCK cells were seeded at low density. The next day cells were cultured for 24 h in the absence (C) or presence of 10 ng/ml SF/HGF (SF) or 100 ng/ml NGF. Magnification, 20 \times . (B) Scattering from confluent cells. Stable transfectant MDCK cells were grown to confluence. Circular wounds were performed with a calibrated disk, and cultures were stimulated or not with 10 ng/ml SF/HGF or 100 ng/ml NGF for 4 d. Magnification, 8 \times . (C) Morphogenesis in Matrigel gel. Stable transfectants of MDCK cells were cultured on Matrigel gels. The following day, cells were incubated with or without (C) 10 ng/ml SF/HGF or 100 ng/ml NGF for 24 h. Magnification, 25 \times .

mous dimerization and autophosphorylation in the absence of the ligand (Taylor *et al.*, 1995). By measuring tyrosine phosphorylation of the immunoprecipitated MET receptor in transiently transfected cells, we verified that the TRK–MET receptors were phosphorylated without NGF and that this effect was only slightly enhanced by NGF (our unpublished results). In addition, the activation of the TRK–MET receptor in the absence of its ligand appeared to be related to the transient transfection, because in stably transfected cells a lower basal transcriptional effect was found (Figure 4, compare A and B).

The Y13–16F TRK–MET Receptor Fails to Bind or Activate GRB2, SHC, PI3K, and GAB1

The transcriptional and the motile responses mediated by the mutated TRK–MET receptor suggested that MET can activate signaling pathways independently of the phosphorylation of its C-terminal tyrosine residues. Nonetheless, previous studies demonstrated that these tyrosine residues are required for recruitment and activation of multiple proteins known to be involved in signal transduction by MET (Ponzetto *et al.*, 1994; Pelicci *et al.*, 1995; Fournier *et al.*, 1996; Weidner *et al.*, 1996; Nguyen *et al.*, 1997). To check the ability of the WT and mutated TRK–MET receptor to recruit these proteins *in vivo*, we performed coimmunoprecipitation experiments in MDCK cells.

After autophosphorylation, the MET receptor can recruit GRB2 directly (Ponzetto *et al.*, 1994; Fournier *et al.*, 1996). Immunoprecipitations were performed using the anti-MET antibody, and immunoprecipitates were analyzed by Western blotting using the anti-GRB2 antibody. As expected, NGF stimulation enhanced the recruitment of GRB2 in WT TRK–MET cell lines, whereas the amount of GRB2 was similar with or without NGF stimulation in stable cell lines expressing Y13–16F TRK–MET (Figure 5A, left panel). The fact that in the Y13–16F TRK–MET cell line (Met* 20) SF/HGF, but not NGF, enhanced GRB2 recruitment demonstrated that signaling mediated by endogenous and chimeric receptors are distinguishable. Similarly, in normal MDCK cells, NGF could induce GRB2 recruitment, after transient transfection of WT, but not of mutated Y13–16F TRK–MET receptors (Figure 5A, right panel).

The MET receptor can also recruit GRB2 indirectly, after SHC adaptor recruitment and activation by MET (Pelicci *et al.*, 1995). After immunoprecipitation of SHC, proteins were analyzed by Western blotting using an anti-GRB2 antibody. In stable cell lines expressing WT TRK–MET receptor, NGF stimulation enhanced recruitment of GRB2 by SHC, whereas in stable cell lines expressing Y13–16F TRK–MET receptor, the quantities of GRB2 were similar with or without NGF stimulation (Figure 5B).

The phosphorylated MET receptor can associate with PI3K (Ponzetto *et al.*, 1993; Rahimi *et al.*, 1996). The association of p85 PI3K with the WT TRK–MET receptor was not detected in stable MDCK cell lines. Because transient transfection allows high expression of the chimeric receptor (see Figure 5A), the recruitment of p85 PI3K was examined in MDCK cells transiently transfected by TRK–MET receptors. Although p85 PI3K was recruited by the WT TRK–MET receptor, it was not recruited by the mutated Y13–16F TRK–MET receptor (Figure 5C). The same result was obtained after cotransfection of TRK–MET receptors and p85 PI3K (our unpublished results).

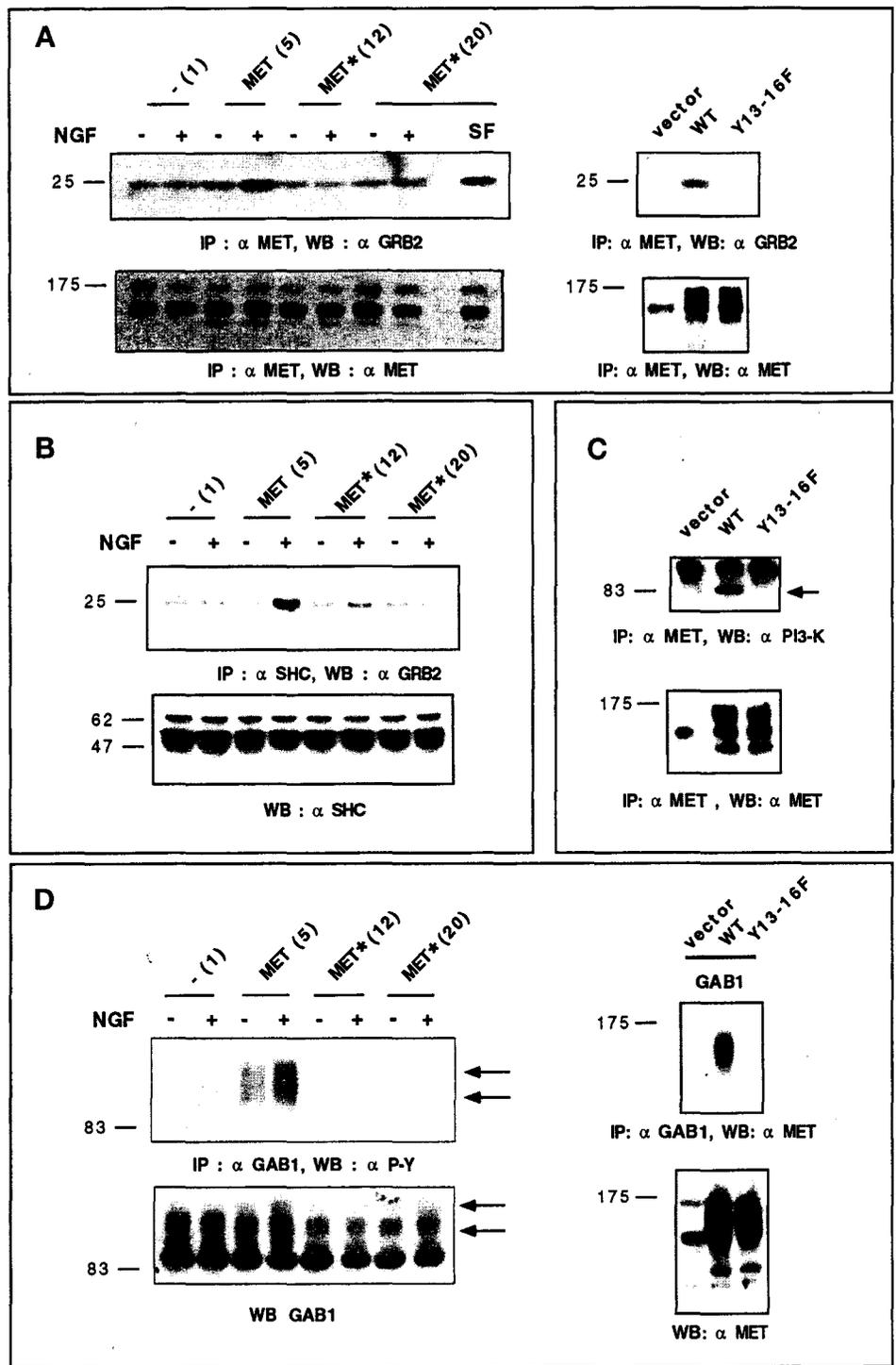
Finally, we investigated the ability of the WT and mutated TRK–MET receptor to activate or to associate GAB1 (Weidner *et al.*, 1996; Nguyen *et al.*, 1997). After immunoprecipitation of GAB1, proteins were analyzed by Western blotting using an anti-phosphotyrosine antibody. In stable cell lines expressing WT TRK–MET receptors, phosphorylation of GAB1 was detected, and stimulation by NGF enhanced its phosphorylation. In contrast, in stable cell lines expressing Y13–16F TRK–MET receptor, phosphorylation of GAB1 was not detected either with or without NGF (Figure 5D, left panel). Similar results were obtained with MDCK cells transiently cotransfected by TRK–MET receptors and an expression vector for GAB1 tagged with a Flag epitope. In contrast to the WT TRK–MET receptor, no detectable binding of mutated TRK–MET receptor was found after immunoprecipitation of GAB1, indicating that the WT but not the mutated TRK–MET receptors can associate with GAB1 (Figure 5D, right panel).

The Mutated TRK–MET Receptor Retains the Ability to Associate and Phosphorylate a ~250-kDa Protein

To determine the ability of the MET receptor to recruit and phosphorylate proteins in MDCK cells, we used a sensitive association–kinase assay, in which immunoprecipitated MET receptors are subjected to an *in vitro* kinase assay using radiolabeled [γ -³³P]ATP (Figure 6A). The immunoprecipitated MET receptors can phosphorylate both themselves and cytoplasmic ligands (Bardelli *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1997). In preliminary experiments, we established that this assay was more sensitive than simple association experiments, in which the phosphorylated proteins are revealed by immunoblot using an anti-phosphotyrosine antibody after immunoprecipitation of MET. The sensitivity of the test was also enhanced by performing transient transfections of the TRK–MET receptors in MDCK cells.

As shown in Figure 6, phosphorylation of the endogenous MET receptor was similarly detected in cells nontransfected (NT) or transfected with the empty

Figure 5. Y13-16F TRK-MET receptor fails to bind or activate known signaling proteins. (A) Left panel, stable transfectants were stimulated (+) or not (-) with 100 ng/ml NGF or 10 ng/ml SF/HGF (SF) for 10 min. Endogenous and hybrid receptors were immunoprecipitated using the anti-MET antibody. Proteins were resolved by 12% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting. Part of the filter was incubated with the anti-GRB2 antibody (top), whereas the other part was incubated with the anti-MET antibody (bottom). Right panel, MDCK cells were transiently transfected with 2 μ g/ml empty, WT, or Y13-16F expression vectors. The following day, cells were stimulated with 100 ng/ml NGF for 10 min. Endogenous and hybrid receptors were then immunoprecipitated using the anti-MET antibody. The proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting. Part of the filter was incubated with the anti-GRB2 antibody (top), whereas the other was incubated with the anti-MET antibody (bottom). (B) Stable transfectants were stimulated (+) or not (-) with 100 ng/ml NGF for 10 min. Cellular extracts were immunoprecipitated using the anti-SHC antibody. Immunoprecipitates were resolved in 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using the anti-GRB2 antibody (top). The amount of SHC in each cellular extract (30 μ g of protein) was determined by Western blotting using the anti-SHC antibody (bottom). (C) MDCK cells were transiently transfected with 2 μ g/ml empty, WT, or Y13-16F expression vectors. The following day, cells were stimulated with 100 ng/ml NGF for 10 min. Endogenous and hybrid receptors were immunoprecipitated using the anti-MET antibody. The proteins were resolved by 7% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting. Part of the filter was incubated with the anti-PI3K antibody (top), whereas the other was incubated with the anti-MET antibody (bottom). (D) Left panel, stable transfectants were stimulated (+) or not (-) with 100 ng/ml NGF for 10 min. Cellular extracts were immunoprecipitated using the anti-GAB1 antibody. Immunoprecipitates were resolved in 7% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using the anti-phosphotyrosine antibody (top). The amount of GAB1 in each cellular extract (30 μ g of protein) was determined by Western blotting using the anti-GAB1 antibody (bottom), and corresponding positions of GAB1 are indicated by arrows. Right panel, MDCK cells were transiently cotransfected with 1 μ g/ml expression vectors of Flag-GAB1 and 1 μ g/ml empty, WT, or Y13-16F expression vectors. The following day, cells were stimulated with 100 ng/ml NGF for 10 min. GAB1 was immunoprecipitated using the anti-Flag antibody, and the proteins were resolved by 7% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using the anti-MET antibody (top). The amount of endogenous and transfected receptor in each cellular extract (50 μ g of protein) was determined by Western blotting using the anti-MET antibody (bottom). Direct Western blot in transient transfection does not allow a clear separation of the ~150-kDa TRK-MET and 145-kDa β -subunit of MET. Left, molecular mass markers.



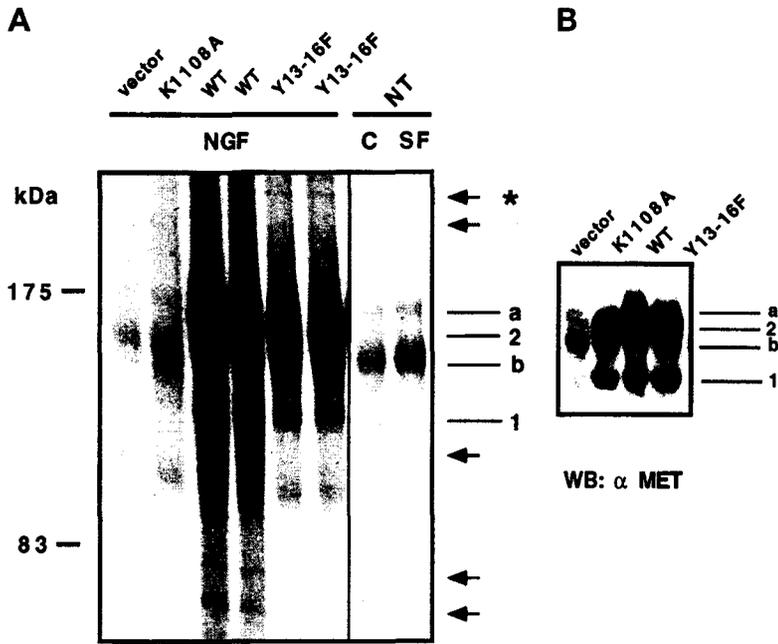


Figure 6. Detection of phosphorylated MET-associated proteins. (A) MDCK cells were transiently transfected with 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ empty (-), kinase-inactive (K1108A), WT, or Y13-16F TRK-MET expression vectors. The following day, cells were stimulated with 100 ng/ml NGF for 10 min. Last two columns, nontransfected MDCK cells were stimulated or not with 10 ng/ml SF/HGF for 10 min. Endogenous and hybrid receptors were then immunoprecipitated using the anti-MET antibody. Immunoprecipitates were subjected to an *in vitro* kinase assay using [γ - ^{33}P]ATP. Phosphorylated proteins were resolved on the same 7% SDS-polyacrylamide gel and visualized by autoradiography. Left, molecular mass markers. Right, MET precursor (a), MET β -subunit (b), nonglycosylated TRK-MET (1), and fully glycosylated TRK-MET (2). Arrows indicate phosphorylated bands detected in WT transfected cells, and the asterisk indicates the phosphorylated band detected both in WT and Y13-16F-transfected cells. (B) Cellular extracts (50 μg of protein) of A were resolved by 7% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using the anti-MET antibody.

vector (vector) or a kinase inactive receptor (K1108A, which fails to bind ATP). In nontransfected cells, stimulation by SF/HGF enhanced the amount of phosphorylated MET, but none of the other phosphorylated bands was clearly detected.

The WT and Y13-16F TRK-MET receptor samples were assayed in duplicate to ensure reproducibility (Figure 6A), and the level of expression of the transfected receptors was verified by Western blotting (Figure 6B). In WT TRK-MET-transfected cells, a number of phosphorylated bands were detected, in particular at molecular masses ranging from 180 to 140 kDa. A lower exposure of the gel allowed identification of the MET and TRK-MET receptors. Outside of this region of the gel, five less-phosphorylated bands were detected at molecular masses of \sim 250, 230, 110, 80, and 70 kDa (Figure 6B, arrows). In Y13-16F TRK-MET-transfected cells, the TRK-MET receptor was less phosphorylated than in WT TRK-MET-transfected cells; a result consistent with the loss of the C-terminal autophosphorylation sites. In agreement with the demonstration that C-terminal tyrosine residues are necessary for recruitment of intracellular proteins (Ponzetto *et al.*, 1994; Pelicci *et al.*, 1995; Fournier *et al.*, 1996; Weidner *et al.*, 1996; Nguyen *et al.*, 1997), four of the phosphorylated MET-associated bands (molecular masses of \sim 230, 110, 80, and 70 kDa) were lost in the Y13-16F TRK-MET receptor versus the WT TRK-MET receptor. Most importantly, the \sim 250-kDa phosphorylated band was still detected in the Y13-16F receptor, suggesting that independently of the phosphorylation of the C-terminal tyrosine residues, the MET receptor can still bind and phosphorylate an intracellular pro-

tein. This phosphorylated band of \sim 250 kDa did not correspond to a known ligand and did not comigrate (our unpublished results) in SDS-PAGE with the \sim 220- and \sim 185-kDa tyrosine-phosphorylated proteins previously identified in MDCK1 cells, an MDCK cell line constitutively dissociated (Webb *et al.*, 1996).

Y13-16F TRK-MET Retains the Ability to Activate RAS Signaling, Which Is Involved in the Scattering Response

As previously reported, SF/HGF and RAS have a similar ability to induce a transcriptional response involving ETS/AP1-binding sites (Fafeur *et al.*, 1997). To investigate whether the RAS pathway is involved in mediating this transcriptional response, stable cell lines were transiently transfected with both the Py-Luc reporter and dominant negative mutants of small GTP-binding proteins, RAS N17 and CDC42 N17. We found that in MET*(12) cells, RASN17 was able to inhibit basal and SF/HGF- or NGF-stimulated transactivation of the Py-Luc reporter gene. In contrast, CDC42N17 was unable to inhibit transactivation; rather, it enhanced these transcriptional responses (Figure 7A). It is worth noting that both stimulated and basal activities could be mediated by the same factors. Similar results were obtained in stable cell lines expressing WT TRK-MET (our unpublished results).

We also investigated in MDCK cells expressing the mutated receptor whether the phosphorylation of ERK1 and ERK2, two target kinases of RAS, were induced by NGF. Cellular extracts of MDCK cells from

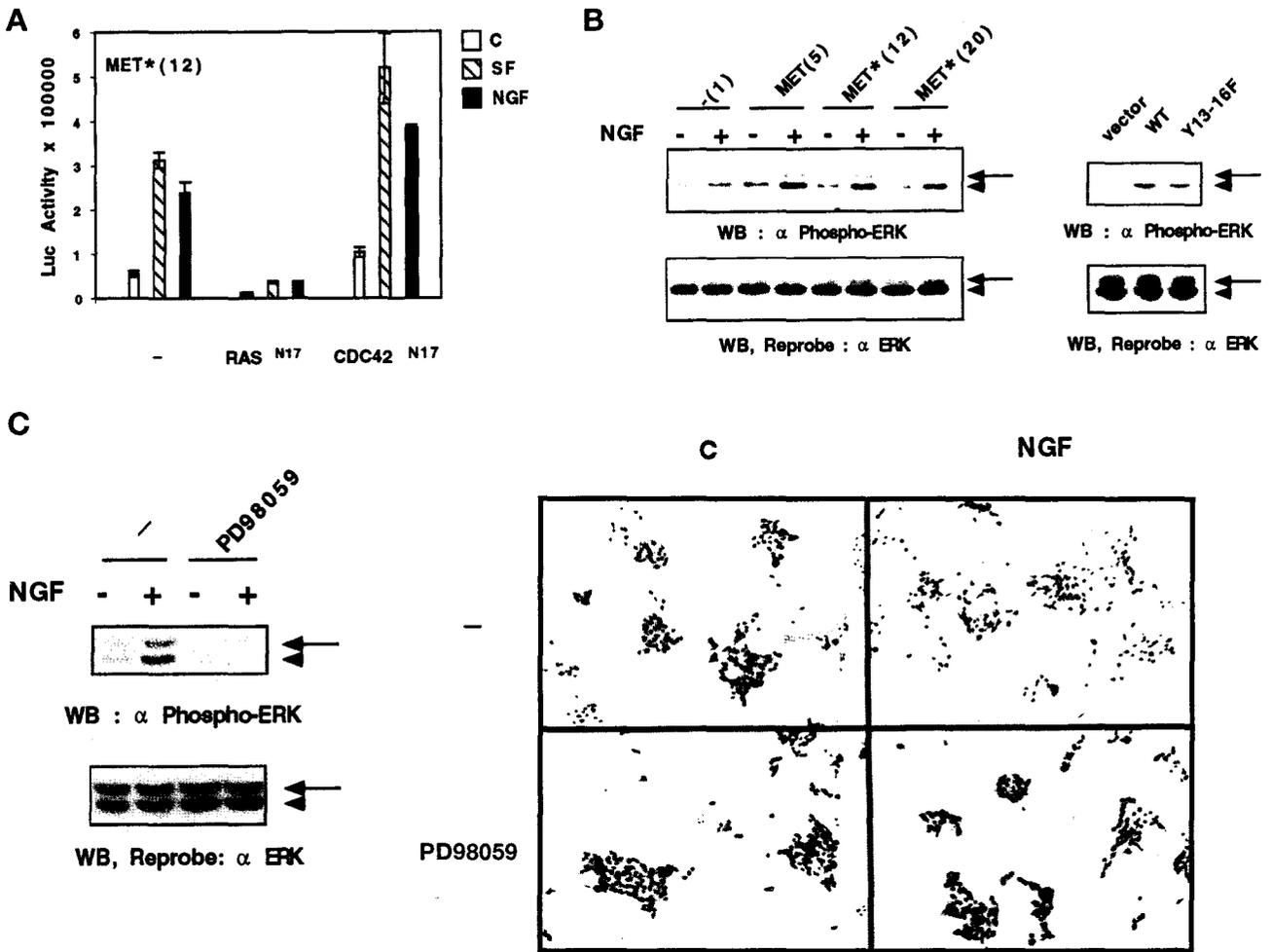


Figure 7. Mutated MET receptor induces RAS signaling, which is necessary for cell scattering. (A) Effect of RAS N17 and CDC42 N17 on transactivation of the Py-Luc reporter vector in a mutated receptor cell line. The stable transfectant of the mutated receptor (MET*, clone 12) was transiently transfected with 0.5 μ g/ml Py-Luc reporter and 0.5 μ g/ml expression vectors of RAS N17 or CDC42 N17 dominant negative mutants. Cells were incubated the next day with 10 ng/ml SF/HGF (dashed bars) or 100 ng/ml NGF (black bars) or without (white bars) for 24 h, and luciferase activity was measured. (B) Effect of the mutated MET receptor on ERK phosphorylation. Left panel, stable transfectants were stimulated (+) or not (-) with 100 ng/ml NGF for 10 min. Right panel, MDCK cells were transiently transfected with 1 μ g/ml empty, WT, or Y13-16F TRK-MET expression vectors and were stimulated the next day by NGF (100 ng/ml). Cellular extracts (50 μ g) were resolved by 10% SDS-PAGE. The proteins were analyzed by Western blotting using an antibody directed against phosphorylated ERK1,2 (top). The filter was dehybridized and reprobbed using the anti-ERK2 antibody, which also recognizes ERK1 (bottom). Arrowhead, position of ERK1; arrow, position of ERK2. (C) Effect of an inhibitor of MEK1 on cell scattering in a mutated receptor cell line. Left panel, stable transfectants expressing the mutated receptor (clone 12) were treated for 45 min with 50 μ M PD98059 and then stimulated (+) or not (-) with 100 ng/ml NGF for 10 min. Fifty micrograms of cellular extract were resolved by 10% SDS-PAGE. The proteins were analyzed by Western blotting using an antibody directed against phosphorylated ERK1,2 (top). The filter was dehybridized and reprobbed using the anti-ERK2 antibody, which also recognizes ERK1 (bottom). Arrowhead, position of ERK1; arrow, position of ERK2. Right panel, stable transfectants expressing the mutated receptor (clone 12) were seeded at low density. The following day cells were treated for 45 min with 50 μ M PD98059 and cultured for 24 h in the presence or absence of 100 ng/ml NGF. Magnification, 20 \times .

stable (Figure 7B, left panel) or transient (Figure 7B, right panel) transfections were Western blotted using an antibody directed against phosphorylated ERK1,2. After NGF stimulation, both WT and Y13-16F TRK-MET receptors were able to mediate the phosphorylation of ERK1,2 in a similar manner (Figure 7B). These phosphorylations of ERK1,2, induced by NGF in the

mutated receptor cell lines, were determined on the same samples that allowed the demonstration of an absence of GRB2 recruitment through SHC activation (see Figure 5B).

Finally, we used PD98059, a pharmacological inhibitor of MEK1, which belongs to the RAS signal transduction cascade leading to the phosphorylation of

ERK1,2. In stable transfectants expressing the mutated Y13–16F receptor, the scattering induced by NGF was abolished by addition of 50 μ M PD98059, demonstrating that the motile response induced by the mutated TRK–MET receptor is transmitted by this downstream pathway of RAS (Figure 7D). In the same experiment, cell extracts were obtained in parallel, and this concentration of PD98059 was found to be effective in inhibiting phosphorylation of ERK1,2 (Figure 7D).

These results demonstrated that the motile response induced by the mutated TRK–MET receptor correlated with its ability to induce ERK1,2 phosphorylation and RAS-dependent transcriptional activation and was abolished after treatment of the cells by an inhibitor of the MEK–ERK1,2 pathway.

DISCUSSION

The recruitment via phosphorylated tyrosine residues of proteins responsible for activation of a signaling pathway is a well-established mechanism used by tyrosine kinase receptors to mediate signal transduction (reviewed in Schlessinger, 1994; Van der Geer *et al.*, 1994). After ligand binding, receptor dimerization, and autophosphorylation, various proteins are recruited to phosphorylated tyrosine residues on the receptor. The MET receptor fits into this scenario, because the two autophosphorylation sites in the C-terminal region of MET, Y14 and Y15, are responsible for the binding of several proteins known to interact with the receptor; these include GRB2, SHC, GAB1, PI3K, PLC γ , SHP2, SRC, and most likely STAT3 (Ponzetto *et al.*, 1994; Pelicci *et al.*, 1995; Fournier *et al.*, 1996; Weidner *et al.*, 1996; Nguyen *et al.*, 1997; Boccaccio *et al.*, 1998). Most of these proteins are capable of activating RAS signaling. For example, the Y15 of MET can specifically recruit GRB2, an adaptor protein that couples activated receptor tyrosine kinases to SOS, promoting activation of RAS (Buday and Downward, 1993; Gale *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993). Both Y14 and Y15 form a multisubstrate-binding site for all other cytoplasmic effectors. When SHC is recruited and phosphorylated by the receptor, it can then associate with GRB2, which activates the RAS pathway (Pelicci *et al.*, 1995). GAB1 is a multifunctional protein that can interact with MET both directly and indirectly via GRB2 (Holgado *et al.*, 1996; Weidner *et al.*, 1996; Nguyen *et al.*, 1997). Its overexpression in epithelial cells leads to phosphorylation of downstream targets of the RAS pathway, the MAP kinases ERK1,2 (Weidner *et al.*, 1996). PI3K consists of two subunits, p85, which contains Src homology 2 domains involved in MET receptor interaction, and p110, the catalytic subunit. The RAS protein has been shown to bind to the p110 subunit (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994), and a constitutively activated mutant form of PI3K can activate the RAS pathway in fibroblasts (Hu *et al.*,

1995). Taken together, these data suggest that mutations of both Y14 and Y15 of the MET receptor could impair activation of the RAS cascade.

The Y13–16F MET Transmits Efficient RAS Signaling

By establishing the relative contribution of these tyrosine residues in transmitting transcriptional activation by the MET receptor, we found that neither single, double, nor complete mutations of the four C-terminal tyrosine residues impaired the transcriptional response. This led us to demonstrate *in vivo* that the Y13–16F MET receptor can transmit efficient RAS signaling, including ERK phosphorylation and RAS-dependent transcriptional activation, despite the fact that this mutated MET receptor, as expected, was unable to recruit GRB2, SHC, GAB1, and PI3K.

Within the family of tyrosine kinase receptors, similar approaches have been undertaken to examine the relative contribution of tyrosine residues in transmitting signal transduction. Mutations of tyrosine residues of the platelet-derived growth factor and NGF receptors abolished the recruitment of signaling proteins and consequently abolished the induction of signaling pathways, including the RAS cascade (Valius and Kazlauskas, 1993; Stephens *et al.*, 1994). Interestingly, the mutations of the tyrosine residues of the EGF and fibroblast growth factor (FGF) receptors abolished the recruitment of all previously identified proteins, including GRB2, but did not impair induction of the RAS cascade (Li *et al.*, 1994; Mohammadi *et al.*, 1996). It is clear that the MET receptor behaves differently than the EGF and basic FGF receptors. Indeed, it was demonstrated that both EGF and FGF receptors mutated on autophosphorylation tyrosine residues can recruit GRB2 indirectly, via SHC activation (Li *et al.*, 1994; Mohammadi *et al.*, 1996), whereas in our study SHC is not activated by the mutated MET receptor.

According to other studies, signal transduction by the mutated tyrosine kinase receptor can be explained by heterodimerization with related endogenous receptors (Wright *et al.*, 1995). In the present study, we provide evidence that the TRK–MET receptor does not function through endogenous MET. In MDCK cell lines expressing TRK–MET receptors, we found that stimulation with NGF induced TRK–MET phosphorylation without affecting phosphorylation of the endogenous MET receptor (Figure 2B). Furthermore, we found that the mutated TRK–MET receptor cannot transmit signal transduction through the endogenous MET receptor. First, using the anti-MET antibody, both the endogenous and transfected receptors were immunoprecipitated from MDCK cells. In cells expressing the mutated TRK–MET receptor, NGF did not induce either recruitment or activation of endogenous MET sub-

strates, such as GRB2, PI3K, and GAB1, whereas SF/HGF was able to induce recruitment of GRB2 (Figure 5). Second, we did not observe a RAS-dependent transcriptional response using kinase defective MET receptors (Y8,9F, which is mutated on tyrosine residues of the kinase region, or K1108A, unable to bind ATP; Figure 1 and our unpublished results). This is in contrast to the demonstration that a kinase-defective EGF receptor can heterodimerize with an ERB2/NEU receptor and that this heterodimer causes activation of RAS signaling (Wright *et al.*, 1995). Finally, by performing transactivation assays in NIH 3T3 fibroblasts, we found that TRK-MET receptors induced a transcriptional response, whereas these cells did not respond to SF/HGF, suggesting that this response is independent of the presence of functional endogenous MET receptors (Figure 1C). It is therefore unlikely that TRK-MET functions through indirect recruitment of proteins via endogenous MET.

A most likely interpretation of our data is that the mutated MET receptor can still recruit and phosphorylate original proteins. To detect the MET-associated and -phosphorylated proteins, a sensitive association-kinase assay was performed from MDCK cells transiently transfected by the TRK-MET receptors. In cells transfected with the WT receptor, at least five MET-associated phosphorylated bands (molecular masses of ~250, 230, 110, 80, and 70 kDa) were detected, which were not observed in nontransfected cells. The phosphorylated bands at ~110, 80, and 70 kDa could correspond to known signaling proteins, i.e., GAB1 (110 kDa), PI3K (85 kDa), SHP2 (80 kDa), and the high-molecular-weight form of SHC (66 kDa). In contrast, the phosphorylated bands of ~250 and 230 kDa did not correspond to known ligands and did not comigrate (our unpublished results) in SDS-PAGE with the ~220- and 185-kDa tyrosine-phosphorylated proteins previously identified in MDCK1 cells, an MDCK cell line constitutively dissociated (Webb *et al.*, 1996). In cells transfected with the mutated receptor, the ~220-, 110-, 80-, and 70-kDa MET-associated bands were lost, whereas the ~250-kDa band was not. This result suggests that the MET receptor is able to bind and phosphorylate a protein independently of the phosphorylation of the C-terminal residues. Further experiments will be aimed to identify this protein and its possible implication in biological effects transmitted by the MET receptor.

RAS Signaling Transmitted by Y13-16F MET Is Sufficient to Promote Cell Motility but Not Cell Morphogenesis

We investigated cell morphogenesis and scattering transmitted by the chimeric TRK-MET receptors. We found that the mutated receptor was unable to pro-

mote branching morphogenesis of MDCK cells. This lost capacity is in agreement with the conclusion of previous studies performed in three-dimensional cultures in collagen gels (Zhu *et al.*, 1994; Weidner *et al.*, 1995; Fournier *et al.*, 1996; Sachs *et al.*, 1996). In the present study, we also demonstrated that the morphogenetic capacity of MDCK cells can be investigated on Matrigel gels; this assay allows the formation of a cellular network by branching morphogenesis over 24 h, a time scale comparable to the one used in a classical scattering assay (Zhu *et al.*, 1994; Weidner *et al.*, 1995; present study), whereas branching morphogenesis in collagen gels requires 1-2 wk.

In contrast to cell morphogenesis, the measurement of cell scattering has given contradictory results as reported by Ponzetto *et al.* (1994), Zhu *et al.* (1994), Weidner *et al.* (1995), and Sachs *et al.* (1996). For example, the mutation of the sole Y15 residue resulted in the abolition of cell scattering in one study (Zhu *et al.*, 1994), whereas mutations of all four Y13-16 residues reduced, but did not abolish, cell scattering in others (Weidner *et al.*, 1995; Sachs *et al.*, 1996). Our present data are in agreement with these last results; we found that the mutations of the four C-terminal tyrosine residues did not impair the ability of the mutated receptor to transmit cell scattering. In contrast, our results contradict those of Zhu *et al.* (1994) and Ponzetto *et al.* (1994), which led to the demonstration that single (Y15) or double mutations (Y14 and Y15) abolished MET receptor-mediated cell scattering. A possible explanation of these contradictory results is suggested by the difficulty in quantifying this response. We circumvented the problem by confirming the cell scattering activity of the mutated MET receptor on representative cell populations and in two different assays (Figure 3, A and B).

The scattering response obtained with WT and Y13-16F TRK-MET receptors correlated with RAS-dependent transcriptional activation of promoters containing ETS/AP1-binding sites. The fact that a pharmacological inhibitor of MEK abolished cell scattering in the mutated cell line demonstrated the implication of this downstream pathway of RAS in the biological response. We propose that in these cell lines, RAS activation contributes to cell scattering by its ability to induce transcriptional activation of cellular gene promoters. These include the promoters of the uPA and collagenase genes. These proteases belong to a complex enzymatic cascade that degrades the extracellular matrix and can contribute to the motility of the cells.

It is still a matter of debate whether cell scattering and morphogenesis are distinct biological activities, occurring through different cytoplasmic effectors and signaling pathways. Nonetheless, when measurements of cell scattering and morphogenesis were established in parallel, it was found that any reduction

in cell scattering correlated with a loss in cell morphogenesis, whereas the inverse relationship was not found (Weidner *et al.*, 1995; Sachs *et al.*, 1996; present study). Furthermore, morphogenetic activity of MET can be transferred onto a scattering receptor, TRK-A, by fusing to it the C-terminal tail of MET containing the Y14-Y15 tyrosine docking site (Sachs *et al.*, 1996). These results indicate that the signaling pathways leading to cell scattering are necessary for cell morphogenesis and/or that morphogenesis requires stronger signaling than scattering. Accordingly, a possible interpretation of our data is that RAS signaling mediated by mutated TRK-MET receptor was sufficient to induce cell scattering, but not cell morphogenesis.

The current model for signal transduction by the MET receptor postulates that the C-terminal tyrosine residues of MET is a unique multifunctional docking site. After phosphorylation of its C-terminal tyrosine residues, various signaling proteins are recruited and activated, which in turn activate signaling pathways and biological effects of SF/HGF, including cell scattering and morphogenesis. We propose that the MET receptor can promote signaling both by recruitment of proteins via the C-terminal docking site and by an additional mechanism, which leads to efficient activation of the RAS pathway and cell scattering.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Sydonia Rayter for the dominant negative form of RAS, Dr. Philippe Chavrier for the dominant negative form of CDC42, Dr. Michael Ostrowski for the uPA-luciferase plasmid, and Dr. Andrew Cato for the collagenase-luciferase plasmid. We also thank Dr. Jean Coll, Dr. Raymond Pierce, and Dr. Catherine Duggan for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Institut Pasteur de Lille and the Centre National de la Recherche Scientifique and by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer and the Association pour la recherche contre le Cancer.

REFERENCES

Bardelli, A., Longati, P., Gramaglia, D., Stella, M.C., and Comoglio, P.M. (1997). Gab1 coupling to the HGF/Met receptor multifunctional docking site requires binding of Grb2 and correlates with the transforming potential. *Oncogene* 15, 3103-3111.

Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (1993). Molecular aspects of mesenchymal-epithelial interactions. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 511-540.

Boccaccio, C., Ando, M., Tamagnone, L., Bardelli, A., Michieli, P., Battistini, C., and Comoglio, P.M. (1998). Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* 391, 285-288.

Bottaro, D.P., Rubin, J.S., Falletto, D.L., Chan, A.M., Kmiecik, T.E., Vande Woude, G., and Aaronson, S.A. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251, 802-804.

Buday, L., and Downward, J. (1993). Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2

adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73, 611-620.

Fafeur, V., Tulasne, D., Quéva, C., Vercamer, C., Dimster, V., Mattot, V., Stéhelin, D., Desbiens, X., and Vandenbunder, B. (1997). The Ets1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter factor-stimulated MDCK epithelial cells. *Cell Growth & Differ.* 8, 655-665.

Fournier, T.M., Kamikura, D., Teng, K., and Park, M. (1996). Branching tubulogenesis but not scatter of Madin-Darby canine kidney cells requires a functional grb2 binding site in the met receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 22211-22217.

Gale, N.W., Kaplan, S., Lowenstein, E.J., Schlessinger, J., and Bar, S.D. (1993). Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature* 363, 88-92.

Gilles, F., Raes, M.B., Stéhelin, D., Vandenbunder, B., and Fafeur, V. (1996). The c-ets-1 proto-oncogene is a new early-response gene differentially regulated by cytokines and growth factors in human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 222, 370-378.

Giordano, S., Ponzetto, C., Di, R.M., Cooper, C.S., and Comoglio, P.M. (1989). Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein. *Nature* 339, 155-156.

Gutman, A., and Wasyluk, B. (1990). The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J.* 2241-2246.

Holgado, M.M., Emlet, D.R., Moscatello, D.K., Godwin, A.K., and Wong, A.J. (1996). A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signaling. *Nature* 379, 560-564.

Hu, Q., Klippel, A., Muslin, A.J., Fantl, W.J., and Williams, L.T. (1995). Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3 kinase. *Science* 268, 100-102.

Klein-Soyer, C., Bereetz, A., Millon-Collard, R., Abecassis, J., and Cazenave, J.P. (1986). A simple in vitro model of mechanical injury of confluent cultured endothelial cells to study quantitatively the repair process. *Thromb. Hemost.* 56, 232-235.

Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar, S.D., Margolis, B., and Schlessinger, J. (1993). Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signaling. *Nature* 363, 85-88.

Li, N., Schlessinger, J., and Margolis, B. (1994). Autophosphorylation mutants of the EGF-receptor signal through auxiliary mechanisms involving SH2 domain proteins. *Oncogene* 9, 3457-3465.

Longati, P., Bardelli, A., Ponzetto, C., Naldini, L., and Comoglio, P.M. (1994). Tyrosines¹²³⁴⁻¹²³⁵ are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* 9, 49-57.

Matsumoto, K., and Nakamura, T. (1996). Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J. Biochem.* 119, 591-600.

Mohammadi, M., Dikic, I., Sorokin, A., Burgess, W.H., Jaye, M., and Schlessinger, J. (1996). Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 16, 977-989.

Montesano, R., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Orci, L. (1991). Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* 67, 901-908.

Nakamura, T., Nawa, K., and Ichihara, A. (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 1450-1459.

Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., and Shimizu, S. (1989). Molecular cloning

- and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342, 440–443.
- Naldini, L., *et al.* (1991). Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *EMBO J.* 10, 2867–2878.
- Nguyen, L., Holgado, M.M., Maroun, C., Fixman, E.D., Kamikura, D., Fournier, T., Charest, A., Tremblay, M.L., Wong, A.J., and Park, M. (1997). Association of the multisubstrate docking protein Gab1 with the hepatocyte growth factor receptor requires a functional Grb2 binding site involving tyrosine 1356. *J. Biol. Chem.* 272, 20811–20819.
- Park, M., Dean, M., Kaul, K., Braun, M.J., Gonda, M.A., and Vande Woude, G. (1987). Sequence of MET proto-oncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6379–6383.
- Pellicci, G., *et al.* (1995). The mitogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the SHC adaptor protein. *Oncogene* 10, 1631–1638.
- Ponzetto, C., Bardelli, A., Maina, F., Longati, P., Panayotou, G., Dhand, R., Waterfield, M.D., and Comoglio, P.M. (1993). A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4600–4608.
- Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., Zonca, P.D., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G., and Comoglio, P.M. (1994). A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77, 261–271.
- Ponzetto, C., Zhen, Z., Audero, E., Maina, F., Bardelli, A., Basile, M.L., Giordano, S., Narsimhan, R., and Comoglio, P. (1996). Specific uncoupling of GRB2 from the met receptor—differential effects on transformation and motility. *J. Biol. Chem.* 271, 14119–14123.
- Rahimi, N., Tremblay, E., and Elliott, B. (1996). Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for hepatocyte growth factor-induced mitogenic signals in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 271, 24850–24855.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D., and Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370, 527–532.
- Rorth, P., Nerlov, C., Blasi, F., and Johnsen, M. (1990). Transcription factor PEA3 participates in the induction of urokinase plasminogen activator transcription in murine keratinocytes stimulated with epidermal growth factor or phorbol-ester. *Nucleic Acids Res.* 18, 5009–5017.
- Sachs, M., Weidner, K.M., Brinkmann, V., Walther, I., Obermeier, A., Ullrich, A., and Birchmeier, W. (1996). Motogenic and morphogenic activity of epithelial receptor tyrosine kinases. *J. Cell Biol.* 133, 1095–1107.
- Schlessinger, J. (1994). SH2/SH3 signaling proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 25–30.
- Schneikert, J., Peterziel, H., Defossez, P.A., Klocker, H., de Launoit, Y., and Bato, A.C. (1996). Androgen receptor-Ets protein interaction: a novel mechanism for steroid hormone mediated down-modulation of matrix-metalloproteinase expression. *J. Biol. Chem.* 271, 23907–23913.
- Stacey, K.J., Fowles, L.F., Colman, M.S., Ostrowski, M.C., and Hume, D.A. (1995). Regulation of urokinase-type plasminogen activator gene transcription by macrophage colony-stimulating factor. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3430–3441.
- Stephens, R.M., Loeb, D.M., Copeland, T.D., Pawson, T., Greene, L.A., and Kaplan, D.R. (1994). Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron* 12, 691–705.
- Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M., and Gray, J. (1987). Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial motility. *Nature* 327, 239–242.
- Taylor, I.C., Roy, S., and Varmus, H.E. (1995). Overexpression of Sky receptor tyrosine kinase at the cell surface or in the cytoplasm results in ligand-independent activation. *Oncogene* 11, 2619–2626.
- Tsafarty, I., Resau, J.H., Rulong, I., Keydar, D., Faletto, D.L., and Vande Woude, G. (1992). The met proto-oncogene receptor and lumen formation. *Science* 257, 1258–1261.
- Valius, M., and Kazlauskas, A. (1993). Phospholipase C- γ and phosphatidylinositol 3 kinase are the downstream mediators of the PDGF receptor's mitogenic signal. *Cell* 73, 321–334.
- Van der Geer, P., Hunter, T., and Lindberg, R.A. (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 10, 251–337.
- Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D., and Stéhelin, D. (1990). The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* 346, 191–193.
- Webb, C.P., Lane, K., Dawson, A.P., Vandewoude, G.F., and Warn, R.M. (1996). C-Met signaling in an HGF/SF-insensitive variant MDCK cell line with constitutive motile/invasive behavior. *J. Cell Sci.* 109, 2371–2381.
- Weidner, K.M., Dicesare, S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J., and Birchmeier, W. (1996). Interaction between gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* 384, 173–176.
- Weidner, K.M., Sachs, M., and Birchmeier, W. (1993). The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 121, 145–154.
- Weidner, K.M., Sachs, M., and Birchmeier, W. (1995). Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2597–2601.
- Wright, J.D., Reuter, C.W., and Weber, M.J. (1995). An incomplete program of cellular tyrosine phosphorylations induced by kinase-defective epidermal growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 270, 12085–12093.
- Zhu, H., Naujokas, M.A., Fixman, E.D., Torossian, K., and Park, M. (1994). Tyrosine 1356 in the carboxy-terminal tail of the HGF/SF receptor is essential for the transduction of signals for cell motility and morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 269, 29943–29948.

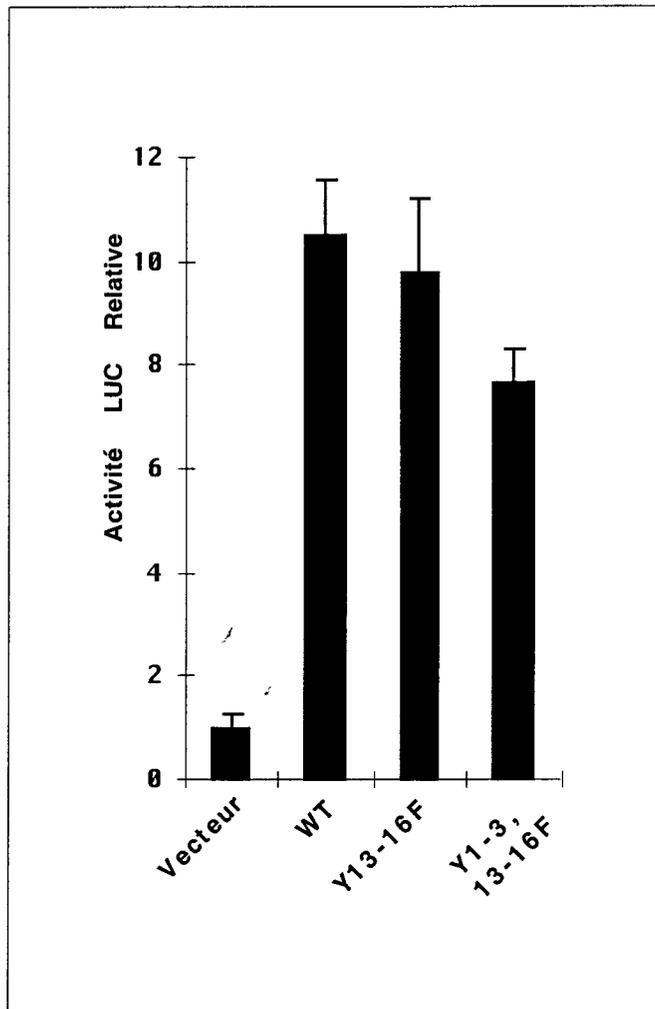


Figure 16 : La mutation des résidus tyrosines de MET, situés hors du domaine kinase, n'abolit pas ses capacités à transmettre une réponse transcriptionnelle via le gène indicateur EBS/AP1-LUC. Les cellules MDCK ont été co-transfectées transitoirement par 0,5 µg/ml de gène indicateur EBS/AP1-Luc et 1 µg/ml de vecteur d'expression vide (vecteur), ou exprimant le récepteur TRK-MET (WT) ou des récepteurs mutés sur différents résidus tyrosines (Y-F). Le jour suivant, les cellules ont été stimulées par 100 ng/ml de NGF, et l'activité luciférase a été mesurée 24 h plus tard.

III. Résultats complémentaires : La mutation de l'ensemble des résidus tyrosines, situés en dehors du domaine kinase, ne semble pas affecter la transactivation

Nos résultats suggèrent qu'il existe de nouveaux sites de recrutement sur le récepteur MET permettant la transduction du signal.

Suite à l'activation du récepteur MET, quatre tyrosines phosphorylées ont été mises à jour (Ponzetto et al., 1993) ; les tyrosines 8 et 9 situées dans le domaine kinase, nécessaires pour l'activité enzymatique du récepteur (Ferracini et al., 1991; Longati et al., 1994) et les tyrosines 14 et 15, du site de recrutement multisubstrat (Ponzetto et al., 1993). Bien que l'autophosphorylation d'autres résidus tyrosines n'ait pas été relatée, nous avons tout de même évalué leur implication pour la transactivation.

Nous avons donc co-transfecté, dans les cellules MDCK le gène indicateur EBS/AP1-Luc et des chimères TRK-MET, mutées ou non sur d'autres résidus tyrosines. Les résultats montrent que la mutation de l'ensemble des résidus tyrosines (TRK-MET^{Y1-3,13-16F}), situés en dehors du domaine kinase, ne modifie pas la réponse transcriptionnelle induite sur le gène indicateur (Figure16).

Cependant, ces résultats ne permettent pas d'exclure définitivement l'implication de résidus tyrosines. En effet, il a été montré que la mutation de la tyrosine 2 induit un phénotype dissocié (Weidner et al., 1995). De plus, nos résultats montrent que la chimère TRK-MET, mutée sur ce résidu, active un peu plus efficacement (environ 20%) la transactivation du gène indicateur EBS/AP1-LUC (Résultats non présentés). L'effet activateur de cette mutation pourrait donc masquer la diminution de réponse obtenue par d'autres mutations. Il serait donc intéressant d'évaluer la conséquence des mutations des résidus tyrosines, tout en conservant intact la tyrosine2.

D'autre part, nous n'avons pas évalué les mutations des neuf résidus tyrosines situés dans le domaine kinase (hormis les résidus 8 et 9, impliqués dans l'activité tyrosine kinase). Bien que de manière générale, il semble que les résidus tyrosines des domaines kinases ne soient pas impliqués dans le recrutement d'effecteur, cette possibilité ne peut pas être exclue.

IV. Discussion et Perspectives

Les résidus tyrosines autophosphorylés de l'extrémité C-terminale de MET, et par conséquent les protéines qu'elles sont capables de recruter, ne sont nécessaires, ni pour l'activation de la voie RAS-ERK, ni pour la dispersion. Ces résultats entraînent de nouvelles questions, notamment :

(i) Quelles sont les régions de MET responsables de cette activation?

(ii) Quelles protéines recrutées par MET, indépendamment du site de liaison multisubstrat, permettent l'activation de la voie RAS-ERK ?

Dans la poursuite de ce travail, je me suis attaché à répondre à la première question, dont les résultats sont présentés en troisième partie. En revanche, mon travail n'a pas porté sur la recherche de nouveaux partenaires de MET, mais le sujet est abordé dans la discussion qui suit.

A. Vers une recherche de nouveaux partenaires de MET

1) Sur la piste de bons candidats

Nos tests d'association/phosphorylation *in vitro*, nous ont permis de visualiser cinq protéines recrutées et phosphorylées par le récepteur TRK-MET^{WT}. Ils s'agit de protéines d'environ 250, 230, 110, 80 et 70 kDa. Avec le récepteur TRK-MET muté (Y^{13, 14, 15, 16} F) seul la protéine de 250 kDa est encore détectée, démontrant que les résidus tyrosines de la partie C-terminale sont bien impliqués dans l'interaction avec des effecteurs, mais qu'ils ne sont pas nécessaires pour tous les recrutements (Figure 6, deuxième publication).

La recherche de l'identification de la protéine de 250 kDa pourrait être le choix le plus novateur. En effet, elle est recrutée par des mécanismes inconnus et elle est potentiellement à l'origine de l'activation de la voie RAS-ERK. Au plus simple, cette protéine pourrait, par exemple, être une protéine adaptatrice, capable de recruter le complexe GRB2/SOS. Cependant, il ne faut pas négliger l'intérêt des autres bandes phosphorylées. En effet, ces protéines pourraient également correspondre à des effecteurs de MET originaux. De plus, le fait que leur détection ne soit plus possible avec TRK-MET muté, valide la spécificité du recrutement.

La stratégie, qui consiste à tester l'implication d'une protéine déjà connue pour son rôle dans la signalisation d'autres récepteurs tyrosines kinases, a depuis longtemps fait ses preuves. Pour le récepteur MET, l'exemple le plus récent est celui de STAT3. Les protéines STAT ont été mises à jour dans la signalisation des récepteurs dépourvus d'activité enzymatique. Par la suite, elles ont été associées à la signalisation de récepteurs de facteur de croissance tel que l'EGF. Enfin, il a récemment été démontré que le récepteur MET est également capable d'activer STAT3 (Boccaccio et al., 1998).

On peut imaginer que la connaissance du poids moléculaire des protéines associées à MET soit un avantage pour mettre sur la piste de protéines déjà connues. En fait, le poids moléculaire ne nous apporte que peu d'information. Pour les protéines d'environ 250 et 230 kDa, aucun candidat évident, impliqué dans la signalisation d'autres récepteurs, ne semble identifié. Pour les protéines de 110, 80 et 70 kDa, le problème est inversé, puisque nous avons l'embaras du choix. De plus, ces protéines pourraient correspondre à des effecteurs de MET déjà identifiés. La protéine de 110 kDa pourrait correspondre à GAB1 (110 kDa), celle de 80 kDa à la PI3K (85 kDa) ou à SHP-2 (80kDa), celle de 70kda à l'isoforme de haut poids moléculaire de SHC (66 kDa). De façon à savoir si ces protéines sont des partenaires de MET originaux, une première étape consisterait donc à vérifier si ces protéines correspondent à des effecteurs déjà connus.

Ainsi, les poids moléculaires des protéines associées à MET ne permettent pas de nous mettre sur la piste de candidats originaux. Il semble donc que l'identification de nouveaux partenaires doivent s'appuyer sur d'autres stratégies.

2) Stratégie biochimique

(a) Les exemples de FRS2 et de PTP-S

La recherche de partenaires pour les récepteurs permet des progrès considérables dans la compréhension des mécanismes de signalisation, mis en jeu par les récepteurs tyrosines kinases. Pour le récepteur au FGF1 (FGFR1), l'identification de nouveaux partenaires devenait urgente. En effet, le récepteur faisait figure de parent pauvre parmi les autres récepteurs tyrosines kinases. Ainsi, seul le recrutement de la PLC γ , par une tyrosine phosphorylée de la région C-terminale de FGFR1, avait pu être mis à jour, alors que comme nous l'avons vu, MET est capable de recruter pour le moins 7 protéines. Néanmoins, le récepteur FGFR1 activé était capable d'induire

également la phosphorylation d'une protéine de 90 kDa. (Rabin et al., 1993). De plus, cette protéine était capable de se lier au récepteur et avec GRB2 (Wang et al., 1996).

Pour cloner ce nouveau partenaire potentiel, les auteurs ont tiré avantage de son interaction avec GRB2 et de sa phosphorylation, quand le FGFR1 est activé. En effet, à partir d'extrait de cellules stimulées par le FGF1, une première purification a été effectuée grâce à une chromatographie d'affinité, à partir du domaine SH2 de GRB2. Ensuite, les extraits ont subi une seconde purification par chromatographie d'affinité, à partir d'anticorps dirigés contre les résidus tyrosines phosphorylés. Suite à ces étapes de purification seule une poignée de protéines, dont une protéine de 90kDa, a été détectée par une coloration protéique conventionnelle. Après digestion de la protéine, purification des fragments et séquençage des premiers acides aminés, des amorces nucléotidiques ont été déduites pour en amplifier l'ADNc par PCR. En fait, la protéine de 90 kDa, rebaptisée FRS2 pour « FGF Receptor Substrat 2 », est constituée de 509 acides aminés. Elle possède un domaine PTB (phospho-tyrosine binding domain) et un domaine de myristilation qui lui permet d'être adressée à la membrane (Kouhara et al., 1997).

Dans le cas du récepteur MET, des stratégies de purification biochimiques ont permis l'identification de la phosphatase PTP-S (Villa-Moruzzi et al., 1998). En résumé, une chromatographie d'affinité, avec des peptides correspondant à la zone du récepteur responsable de l'interaction avec la phosphatase, a permis la purification de fractions protéiques. Ensuite, grâce à l'activité phosphatase, les auteurs ont sous-sélectionné les fractions. La faible quantité de protéines récupérées n'a pas permis de révéler les protéines par une coloration conventionnelle; les possibilités de séquençage, puis d'identification de la protéine semblaient réduites. En revanche, aiguillés par l'activité phosphatase, les auteurs ont testé différents anticorps dirigés contre des phosphatases déjà connues. En fait, les protéines d'une des fractions ont été reconnues par un anticorps dirigé contre la phosphatase PTP-S.

(b) Le tir à l'arbalète

Bien que mes compétences en purification biochimique de protéines soient équivalentes à mes compétences au tir à l'arbalète, les exemples cités précédemment révèlent deux informations importantes. La stratégie biochimique nécessite des protéines en grande quantité et purifiées efficacement. Dans les exemples de FRS2 et PTP-S, les auteurs ont tiré parti des caractéristiques de la protéine ciblée pour mettre en place des méthodes de purification efficace.

Dans notre cas, dans l'hypothèse où les cinq protéines, détectées par le test d'association/phosphorylation, ne correspondaient pas à des partenaires connus, les informations seraient très réduites. Dans ces conditions, la mise en place d'une stratégie de purification biochimique élaborée serait impossible. La caractérisation plus précise de ces protéines semble donc être une étape préliminaire importante. On peut, par exemple, se demander si ces protéines sont capables de se lier à GRB2, comme FRS2, ou cartographier la région du récepteur impliquée dans l'interaction, comme pour PTP-S.

3) Stratégie de biologie moléculaire

(a) Les exemples de BAG et GAB

Pour le récepteur MET, deux stratégies s'appuyant sur des compétences de biologie moléculaire ont permis de mettre à jour deux nouveaux partenaires.

Dans le premier cas, une banque d'expression d'un embryon de souris a été criblée avec une protéine recombinante, constituée de la région intracellulaire de MET. Le séquençage de l'ADNc des clones positifs a permis l'identification de BAG1 (Bardelli et al., 1996). Cette technique a donc été efficace. Néanmoins, l'hameçon utilisé pour cribler la banque, n'est pas une protéine MET activée (le récepteur n'est pas phosphorylé). Par définition, cette stratégie permet l'identification de protéines constitutivement liées au récepteur.

Dans le deuxième cas, la technique du double hybride a permis l'identification de GAB1 (Weidner et al., 1996). L'hameçon utilisé a été une protéine de fusion entre MET et LEXA, qui permet la dimérisation, donc l'activation des récepteurs. Dans ces conditions, les protéines mises à jour interagissent avec le récepteur activé.

(b) Le tir à l'arqebuse

Bien que mes compétences en double hybride soient équivalentes à mes compétences au tir à l'arqebuse, il semble que la stratégie du double hybride soit très adaptée pour révéler les interactions entre un récepteur activé et ses effecteurs. Notre collaboration avec M. Weidner, nous a permis d'obtenir plus d'informations sur les expériences de double-hybride, qu'il a mené avec le récepteur MET. En fait, tous les clones positifs, obtenus en double hybride, ont été analysés. La

grande majorité des clones correspondaient à des effecteurs déjà connus, alors que les autres clones correspondaient à GAB1. Ainsi, ses investigations ne laissent pas de place pour d'autres effecteurs encore inconnus. Néanmoins, cette stratégie ne doit pas être écartée. En effet, l'obtention de partenaires par double hybride est dépendante de la banque d'ADNc utilisée. Or, M. Weidner n'en a utilisée qu'une. D'autre part la recherche en double hybride n'a été réalisée qu'avec le récepteur MET sauvage. Quels résultats auraient été obtenus avec un récepteur muté sur les résidus C-terminaux ?

Ces arguments nous ont poussé à reprendre sur de nouvelles bases et en collaboration avec des personnes compétentes, la stratégie de double hybride. Bien que M. Weidner travaille désormais dans un groupe privé, nous lui avons fait des propositions de collaborations allant dans ce sens. D'autre part, Vincent Chopin, un chercheur en stage postdoctoral spécialiste des purifications biochimiques des protéines, a récemment rejoint le laboratoire ; son objectif est l'identification de nouveaux partenaires du récepteur MET.

B. Implication des résidus tyrosines pour l'activation de la voie RAS-ERK : les exemples d'autres récepteurs tyrosines kinases

Nos résultats montrent que les résidus tyrosines autophosphorylés de l'extrémité C-terminale de MET ne sont pas nécessaires pour l'activation de la voie RAS-ERK. Bien que nos investigations sur l'implication des résidus tyrosines de MET ne sont pas complètes, l'étude du fonctionnement d'autres récepteurs tyrosines kinases ouvre la possibilité de mécanismes de recrutement et d'activation de voies de signalisation, indépendamment des résidus tyrosines

Le récepteur FGFR1 muté sur les quatre résidus tyrosines phosphorylés, situés hors du domaine kinase, induit efficacement la phosphorylation des kinases ERK et la différenciation neuronale des cellules PC12 (Mohammadi et al., 1996). En fait, c'est le domaine juxtamembranaire du FGFR1 qui est nécessaire pour ces réponses, alors qu'il contient des résidus tyrosines mais dont l'autophosphorylation n'a pas été mise en évidence (Lin et al., 1998). De plus, par des expériences de double hybride, il a été montré qu'une vingtaine d'acides aminés du domaine juxtamembranaire (n'incluant pas de résidus tyrosines) sont nécessaires pour l'interaction avec le domaine PTB de la protéine FRS2 (Xu et al., 1998). Par ses capacités à

interagir avec des protéines de signalisation, comme SHP2 (Hadari et al., 1998) ou GRB2 (Mohammadi et al., 1996; Wang et al., 1996), FRS2 pourrait être responsable de l'activation de la voie RAS-ERK et de la différenciation neuronale.

Le récepteur TRKA est également capable d'activer la protéine FRS2. Dans ce cas, la délétion de trois acides aminés (KFG), situées dans la région juxtamembranaire, provoque la perte de l'activation de FRS2 et l'abolition de la différenciation neuronale des cellules PC12 (Peng et al., 1995).

Ainsi, il semble que le domaine PTB de FRS2, qui est responsable dans d'autres protéines de l'interaction avec des tyrosines phosphorylées, soit capable d'interagir avec des séquences peptidiques, des récepteurs FGFR1 et TRKA, ne comportant pas de tyrosine phosphorylée, ni même de tyrosine .

Ce mode de recrutement original remet en question la vision classique selon laquelle, les récepteurs tyrosines kinases ne recrutent les protéines cytoplasmiques que via des résidus tyrosines phosphorylés, et confortent a priori nos résultats obtenus sur la signalisation de MET.

Troisième partie : Cartographie fonctionnelle du récepteur MET

I. Introduction

En fin d'année 1997, D. Besser et ses collaborateurs publient un article décrivant l'influence des tyrosines phosphorylées de la partie C-terminale de l'oncogène TPR-MET sur la régulation du promoteur murin de l'uPA. Leurs résultats démontrent que la mutation des résidus 14 et 15 abolit complètement l'expression d'un gène indicateur placé sous le contrôle du promoteur du gène de l'uPA (de -8200 pb à +398 pb) (Besser et al., 1997).

Ces résultats ont été publiés au moment même où nous montrions que les mêmes mutations, sur la chimère TRK-MET, n'avaient aucune influence sur la transactivation d'éléments de réponse EBS/AP1, ou sur un fragment du promoteur murin de l'uPA centré sur les sites EBS/AP1 (fragment -2446 à -2356 pb lié au promoteur proximal -114 à +398 pb). Bien que les fragments de promoteur de l'uPA ne soient pas identiques entre les deux études, les résultats paraissaient contradictoires.

TPR-MET est issu d'une fusion entre la région N-terminale de TPR et la partie intracellulaire de MET. En fait la partie intracellulaire est amputée dans la région juxtamembranaire de 55 acides aminés. Les parties intracellulaires de MET et TPR-MET ne sont donc pas strictement identiques (Figure 19).

D'autre part, il existe chez la souris un épissage alternatif d'un exon du gène *met* (Lee and Yamada, 1994). L'épissage provoque la perte de 47 acides aminés dans la région juxtamembranaire du récepteur (Figure 19). La protéine tronquée (MET^{Δ1}), est détectée principalement dans le rein (Lee and Yamada, 1994). Bien que les travaux portant sur cet épissage alternatif ne soient pas nombreux, il est clair que la délétion a de fortes conséquences sur l'activation des voies de signalisation. En effet, l'analyse des protéines phosphorylées sur des résidus tyrosines montre, que suite à l'activation du récepteur sauvage, les phosphorylations de nombreuses protéines sont distinctes de celles induites suite à l'activation du récepteur MET^{Δ1} (Lee and Yamada, 1995).

L'interruption de séquence, sur la partie MET fusionnée à TPR, se situe, à un acide aminé près, au même endroit que la délétion suite à l'épissage alternatif (Figure 19). TPR-MET et MET^{Δ1} ont donc en commun la perte de la même région juxtamembranaire.

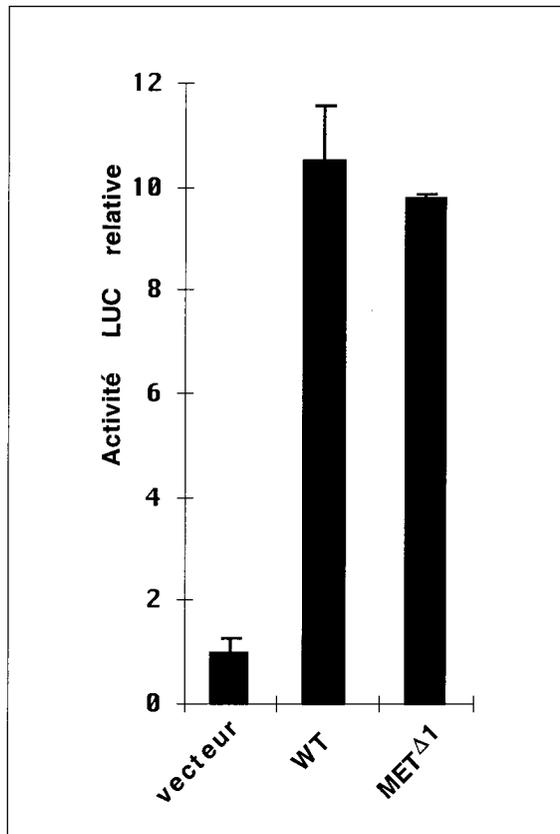


Figure 17 : La délétion de la région juxtamembranaire de MET n'affecte pas ses capacités à transmettre une réponse transcriptionnelle via le gène indicateur EBS/AP1-LUC. Les cellules MDCK ont été co-transfectées transitoirement par 0,5 μ g/ml de gène indicateur Py-Luc et 1 μ g/ml de vecteur d'expression vide (vecteur), exprimant le récepteur TRK-MET (WT), ou exprimant le récepteur chimère délété dans la région juxtamembranaire (MET Δ 1). Le jour suivant, les cellules ont été stimulées par 100 ng/ml de NGF, et l'activité luciférase a été mesurée 24 h plus tard.

Ces deux informations nous permettent d'imaginer que la région juxtamembranaire de MET joue un rôle important dans l'initiation des voies de signalisation et permettrait d'expliquer les résultats divergents obtenus en test de transactivation avec l'oncogène TPR-MET et la chimère TRK-MET.

II. Résultats

A. Implication de la partie juxtamembranaire dans l'activation du récepteur MET

1) Délétion de la région juxtamembranaire

Dans le but d'évaluer l'impact de la délétion de cette partie du domaine juxtamembranaire, sur les réponses induites par MET dans les cellules épithéliales, M. Weidner et ses collaborateurs ont construit une chimère TRK-MET équivalente à MET^{Δ1} (TRK-MET^{Δ1}).

Selon leur méthodologie habituelle, ils ont co-transfecté des cellules MDCK avec les vecteurs exprimant la construction TRK-MET^{Δ1} et un vecteur portant la résistance à la néomycine. Ensuite, la capacité des clones résistants à se disperser suite à la stimulation par le NGF a été évaluée. Lorsque la chimère TRK-MET sauvage a été transfectée, 10 à 20% des clones résistants (correspondant à la proportion des clones résistants exprimant effectivement le récepteur chimère) ont été capables de se disperser sous l'action du NGF. Pour le récepteur TRK-MET^{Δ1}, aucun clone résistant n'a été capable de se dissocier sous l'action du NGF. M. Weidner et ses collaborateurs ont alors considéré, sans autre forme de procès, que le récepteur TRK-MET^{Δ1} ne présentait pas d'intérêt majeur (communication personnelle).

2) TRK-MET^{Δ1} induit la transactivation du gène indicateur EBS/AP1-Luc

Il est évident que nous avons profité de cette construction pour connaître l'influence de la délétion de la région juxtamembranaire sur l'activation transcriptionnelle des éléments EBS/AP1. En fait, la chimère TRK-MET^{Δ1} transactive le gène indicateur EBS/AP1-Luc aussi efficacement que la chimère sauvage (Figure 17). Cependant, les vérifications de routine nous ont apporté des informations déconcertantes. En effet, le récepteur TRK-MET^{Δ1} ne subit pas de phosphorylation détectable suite à son activation (Figure 18 A). De plus il est incapable de recruter GRB2 (Figure

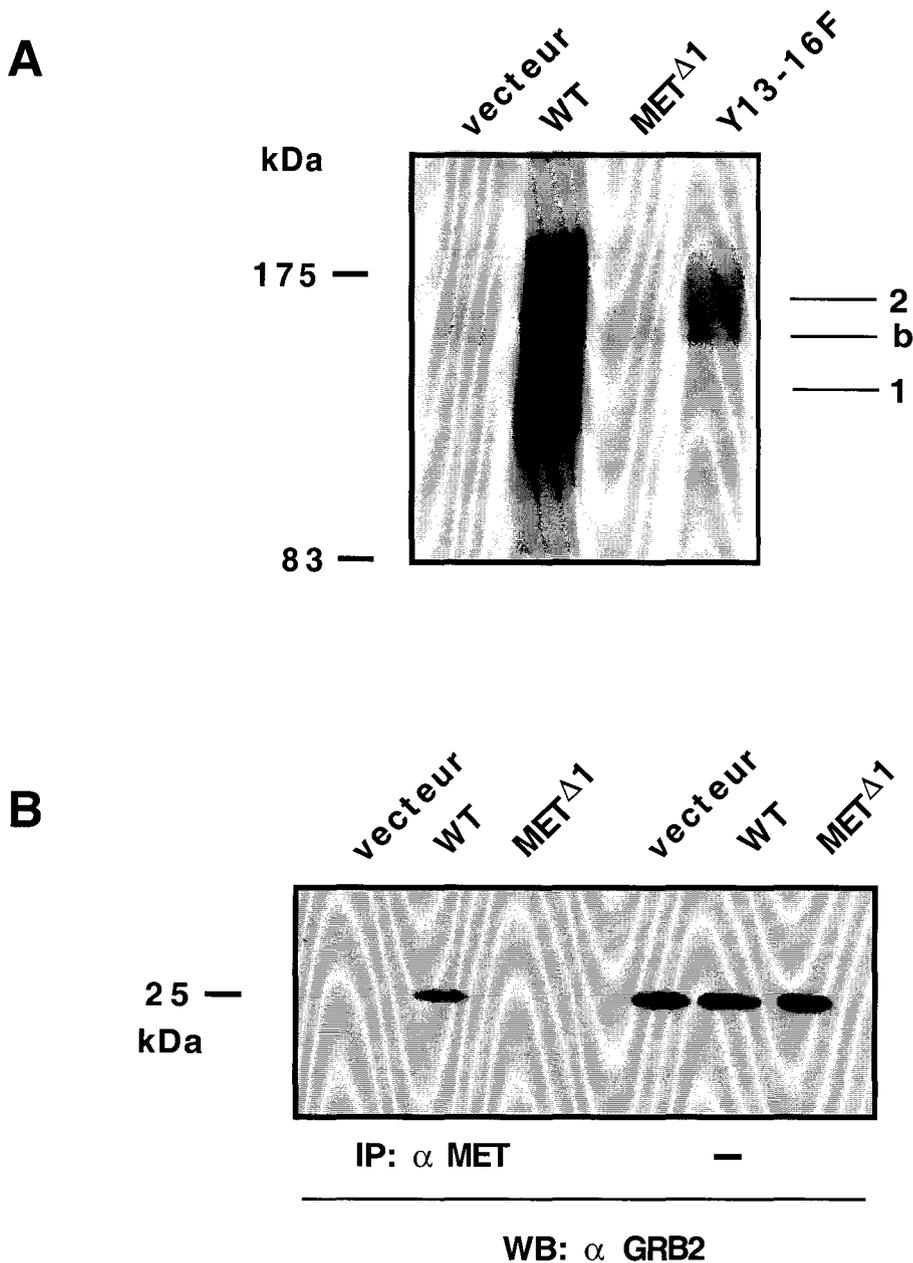


Figure 18: La délétion de la région juxtamembranaire de MET provoque l'abolition de l'autophosphorylation du récepteur et la perte du recrutement de GRB2. Les cellules MDCK ont été transfectées transitoirement par 2 $\mu\text{g/ml}$ de vecteur d'expression vide (vecteur), exprimant le récepteur TRK-MET (WT), le récepteur TRK-MET délété de la région juxtamembranaire ($\text{MET}^{\Delta 1}$), ou exprimant le récepteur muté sur les tyrosines de la région C-terminale (Y13-16F). Le jour suivant les cellules ont été stimulées par 100 ng/ml de NGF pendant 10 min. Les récepteurs endogènes et chimères ont été immunoprécipités par un anticorps anti-MET.

(A) Les protéines immunoprécipitées ont subi une réaction kinase *in vitro*, en présence de $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$. Les protéines phosphorylées ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 7% et détectées par auto-radiographie. A gauche, marqueur de poids moléculaire. A droite, MET sous unité β (b), TRK-MET non glycosylé (1), et TRK-MET glycosylé (2).

(B) 10 $\mu\text{g/ml}$ de protéines avant immunoprécipitation (à gauche) et les protéines immunoprécipitées (à droite) ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 12% et analysées en immuno-blot avec un anticorps anti-GRB2.

18 B). Ainsi, bien que la réponse transcriptionnelle soit conservé, il semble que l'activation du récepteur TRK-MET^{Δ1} soit fortement perturbée.

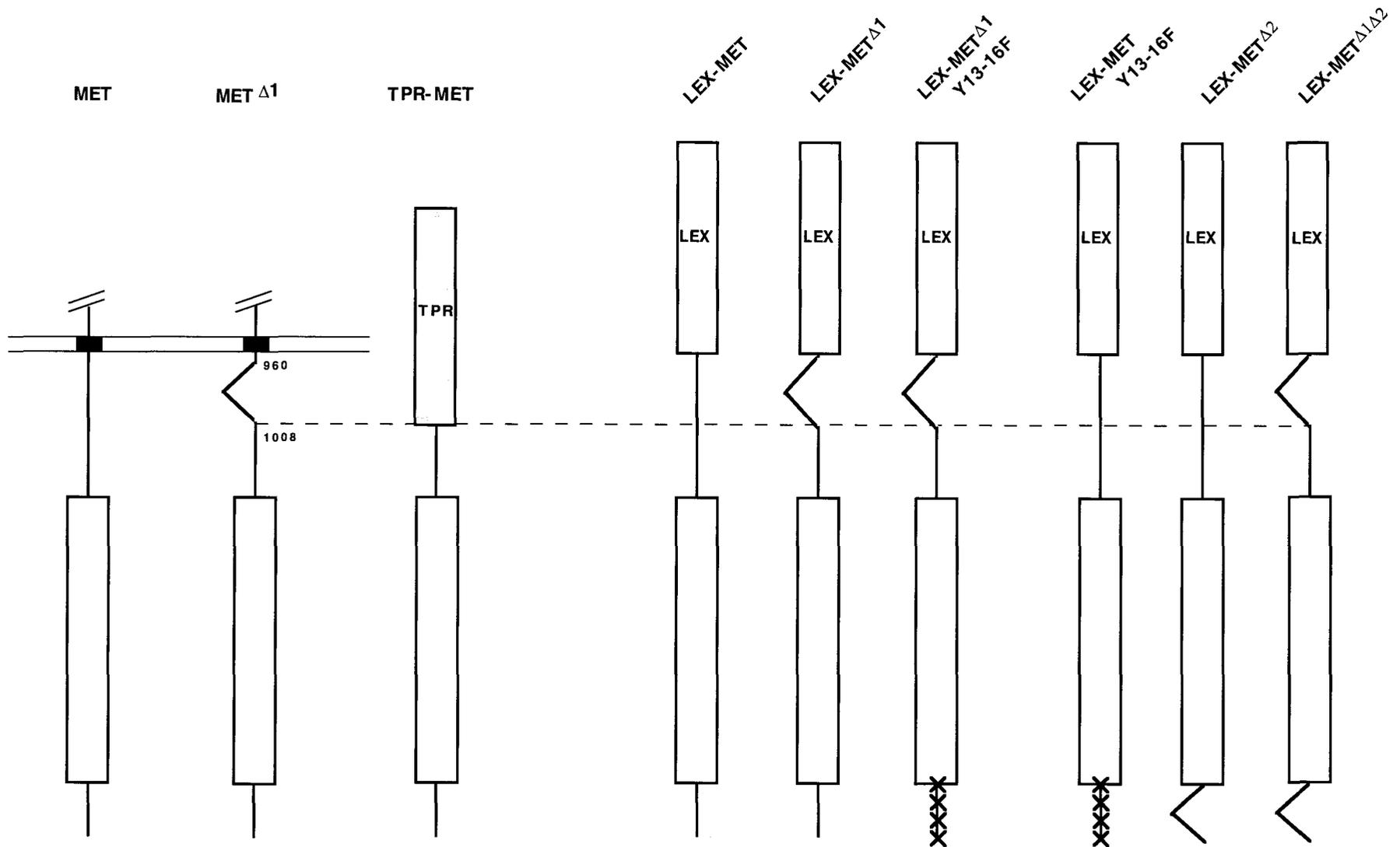
A ce stade, la poursuite de nos investigations n'a pas été possible. En effet, depuis juin 98, la société Santa Cruz, le seul fournisseur commercial d'anticorps dirigés contre la protéine murine MET, a rencontré de gros problèmes dans le renouvellement d'un anticorps efficace. Par exemple, des projets de constructions de chimères supplémentaires, comme des récepteur TRK-MET^{Δ1} muté sur les tyrosines de la partie C-terminale, ont dû être repoussés.

3) Intérêt de la poursuite du travail

Des expériences ont montré que la transfection stable dans les cellules NIH3T3, de protéines MET tronquées, constituées exclusivement de la partie intracellulaire sont capables de s'autophosphoryler et d'induire la transformation (Zhen et al., 1994). Or, la délétion de la région juxtamembranaire abolit à la fois leur autophosphorylation et la transformation. Les auteurs concluent que la région juxtamembranaire est impliquée dans la dimérisation des parties intracellulaires. Il est possible que pour TRK-MET^{Δ1}, la perte de la région juxtamembranaire perturbe également la dimérisation des récepteurs ce qui aurait pour conséquence la perte de l'autophosphorylation.

La capacité de la chimère TRK-MET^{Δ1} à induire la transactivation, sans activation par autophosphorylation, suggère que l'activité tyrosine kinase n'est pas indispensable pour cette réponse. En fait il n'en est rien, puisque nous avons montré que les résidus tyrosines 8 et 9 et le résidu lysine 1112, indispensables à l'activité tyrosine kinase, sont requis pour l'obtention de cette même réponse transcriptionnelle (Figure 1, deuxième publication). En revanche il est possible que la chimère TRK-MET^{Δ1} soit activée de façon très discrète, ce qui aurait pour conséquence une activation incomplète des voies de signalisation.

Quoi qu'il en soit, bien que les investigations aient été rendues momentanément impossible par l'absence d'anticorps, le décryptage des mécanismes d'activation de MET^{Δ1} pourrait permettre de mieux caractériser la fonction de cette isoforme.



**Figure 19 : Représentation schématique de l'isoforme MET $\Delta 1$ en comparaison avec MET et TPR-MET.
Représentation de l'ensemble des fusions LEX-MET construites.**

B. Stratégie LEX-MET

1) Mise en place de la stratégie

La délétion de la partie juxtamembranaire, sur une chimère TRK-MET, perturbe l'activation du récepteur. Dans l'hypothèse où la région juxtamembranaire aurait un rôle à jouer dans le recrutement de protéines de signalisation, cette implication serait impossible à évaluer. En effet, ce rôle serait immanquablement masqué par la perturbation de l'activation du récepteur.

En revanche, pour TPR-MET la perte de la région juxtamembranaire ne perturbe pas l'autophosphorylation de la protéine (Rodrigues and Park, 1993). On peut penser que dans ce contexte, le domaine de dimérisation de TPR compense aisément la perte de fonction. Ainsi pour étudier l'implication du domaine juxtamembranaire dans les voies de signalisation, il semble judicieux de tirer parti des caractéristiques de TPR-MET. D'autre part, l'utilisation des chimères est rendue impossible par l'absence d'anticorps dirigés contre MET.

Ces arguments m'ont poussé à construire de nouvelles protéines de fusion entre la protéine LEXA et la partie intracellulaire de MET. En effet, LEXA cumule diverses avantages: (i) LEXA contient un domaine de dimérisation ; (ii) il existe une batterie d'anticorps dirigés contre LEXA ; (iii) il existe des vecteurs commerciaux où la séquence de LEXA est suivie de sites de restriction en phase de lecture, facilitant la création de protéines de fusion avec LEXA.

LEXA est une protéine bactérienne capable de lier l'ADN en dimère (Schnarr et al., 1988), qui est utilisé couramment dans la technique du double hybride. En fait, des protéines de fusion LEX-MET ont déjà été utilisées en double hybride, et la découverte de GAB1, grâce à ce type de fusion, semble être la garantie de leur efficacité (Weidner et al., 1996).

2) Trois constructions pour une première approche

(a) Le cahier des charges est respecté

Le choix de ces trois constructions a évidemment été motivé par les hypothèses de travail. De façon à connaître l'implication de la partie juxtamembranaire, nous avons donc construit des fusions LEX-MET dont la partie juxtamembranaire est présente ou non (LEX-MET et LEX-MET^{Δ1}). La construction LEX-MET^{Δ1} a également été déclinée dans une version dépourvue des résidus tyrosines C-terminaux (LEX-MET^{Δ1,Y13,16F}) (Figure 19).

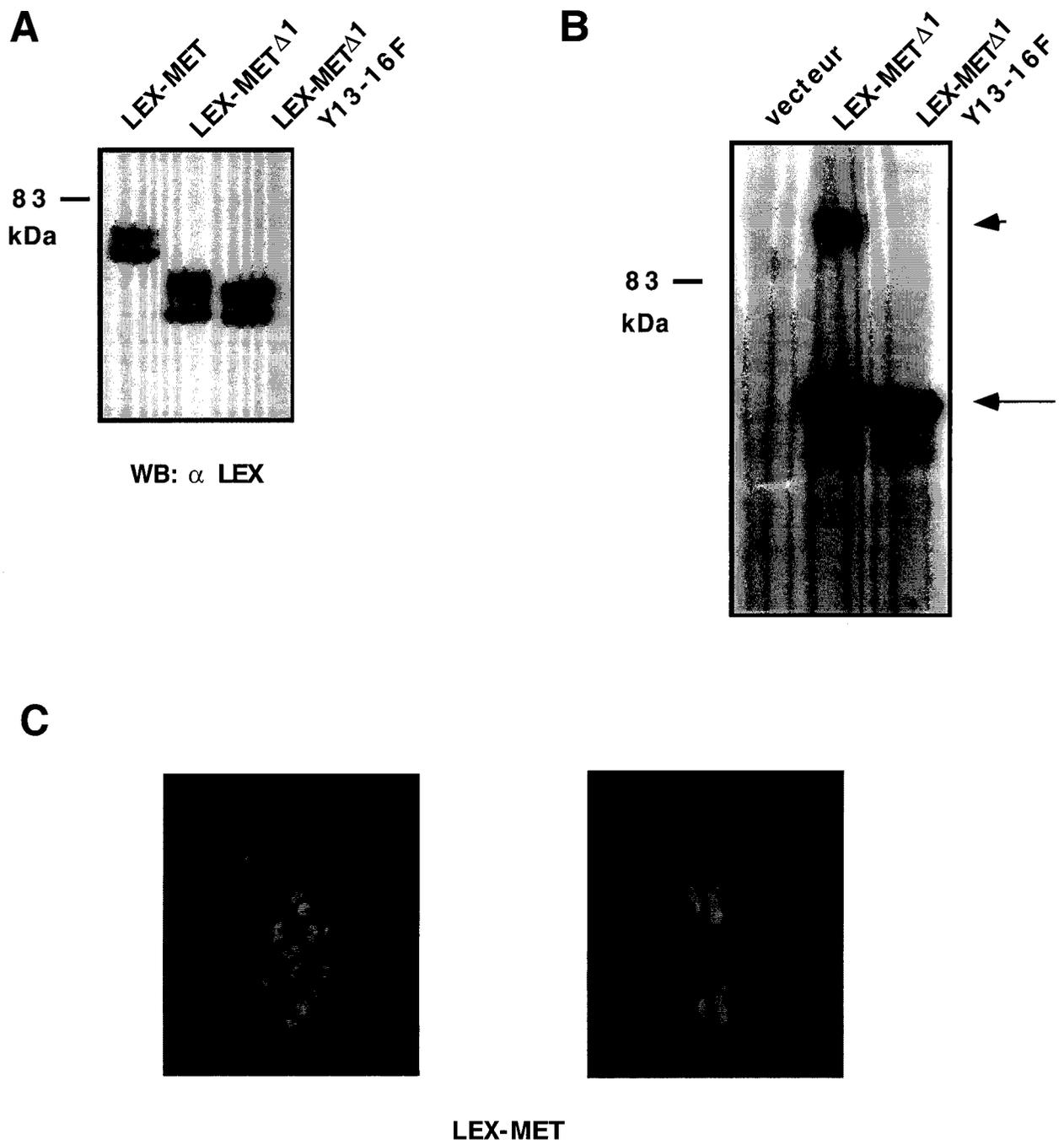


Figure 20: Expression, autophosphorylation et localisation cellulaire des fusions LEX-MET. Les cellules MDCK ont été transfectées transitoirement par 2 μ g/ml de vecteur d'expression vide (vecteur) ou de vecteur exprimant la fusion LEX-MET, LEX-MET Δ 1 ou LEX-MET Δ 1Y13-16F.

(A) 30 μ g/ml de protéines ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 10% et analysées en immunoblot avec un anticorps anti-LEXA.

(B) Les fusions LEX-MET ont été immunoprécipitées par un anticorps anti-LEXA. Les protéines immunoprécipitées ont subi une réaction kinase *in vitro* en présence de [γ -³³P]ATP. Les protéines phosphorylées ont été séparées sur un gel 10% de polyacrylamide-SDS et détectées par auto-radiographie. A gauche, marqueur de poids moléculaire. A droite, flèche: fusions LEX-MET phosphorylées; tête de flèche: bande phosphorylée et associée à la fusion.

(C) Les cellules ont été fixées et une détection en immunofluorescence avec un anticorps anti-LEXA (à droite) suivie d'une contre-coloration nucléaire par le Hoescht (à gauche) ont été réalisées.

Ces premières constructions nous permettent d'abord de vérifier que la stratégie répond bien au cahier des charges. En premier lieu, suite à une transfection transitoire des constructions dans les cellules MDCK, les anticorps dirigés contre LEXA permettent bien une détection efficace des fusions LEX-MET par immuno-blot (Figure 20 A) et par immunoprécipitation (résultats non présentés). Les anticorps anti-LEX permettent également, par immunofluorescence, de déterminer la localisation cellulaire des fusions. Les trois fusions ont été détectées à la fois dans le cytoplasme et le noyau (Figure 20 C). La localisation cytoplasmique n'est pas étonnante puisque les fusions ne possèdent plus de domaine transmembranaire qui permet l'adressage des récepteurs MET à la membrane.

Ensuite, des tests de phosphorylation/association démontrent que les constructions LEX-MET^{WT}, LEX-MET^{Δ1} et LEX-MET^{Δ1Y13-16F} s'autophosphorylent quand elles sont transfectées (Figure 20 B) (résultat non présenté pour LEX-MET^{WT}). Ainsi un autre objectif est atteint, puisque la délétion de la région juxtamembranaire ne perturbe pas l'autophosphorylation des protéines LEX-MET. De plus, les tests de phosphorylation/association confirment que la présence des résidus tyrosines permet le recrutement de protéines cytoplasmiques. Ainsi, alors que suite à la transfection de LEX-MET^{Δ1} une protéine associée de 110 kDa (sans doute GAB1) est détectée, pour la construction LEX-MET^{Δ1Y13-16F} la bande à 110 kDa n'est plus détectable.

(b) Le domaine juxtamembranaire n'est pas impliqué dans la transactivation

Des tests de transformation et de transactivation offrent des résultats intéressants. La fusion LEX-MET^{Δ1} étant directement inspirée de l'oncogène TPR-MET, la fusion devrait induire la transformation des cellules NIH3T3. En fait, la fusion LEX-MET^{Δ1} provoque bien la transformation des fibroblastes. De plus, la protéine LEX-MET^{Δ1Y13-16F} en est incapable (Figure 21). Ces résultats confirment ceux obtenus avec TPR-MET; le site de liaison multisubstrat est indispensable pour la transformation (Fixman et al., 1995).

Les tests de transactivation offrent, quant à eux, des résultats plus originaux. En effet, LEX-MET^{WT}, LEX-MET^{Δ1} et LEX-MET^{Δ1Y13-16F} transactivent avec la même efficacité le vecteur indicateur EBS/AP1-Luc (Figure 22). Contrairement à mon hypothèse de départ, ces résultats démontrent que la région juxtamembranaire n'est pas requise pour la transactivation.

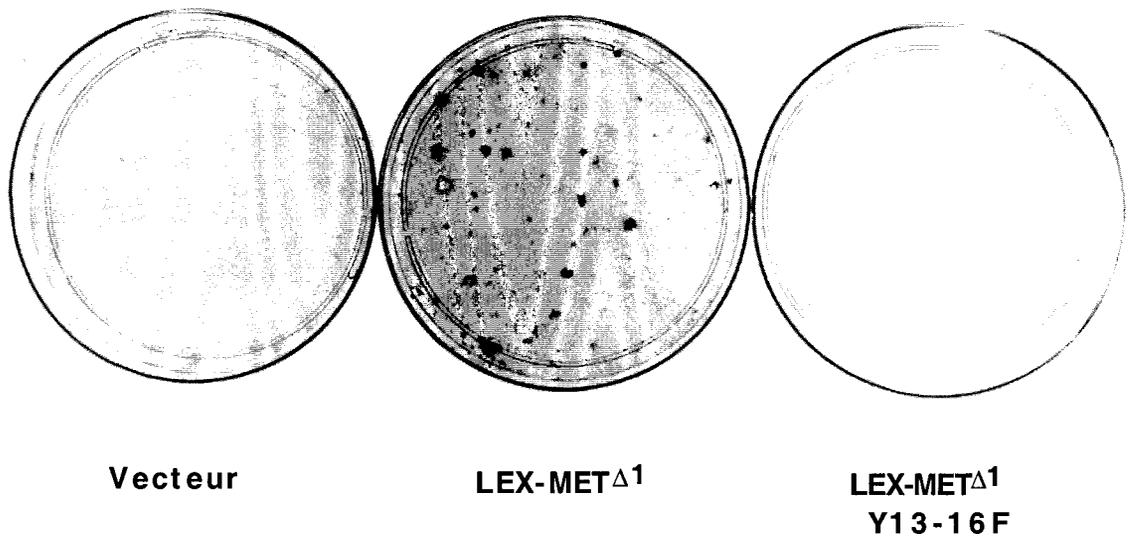


Figure 21: LEX-MET $\Delta 1$ induit la transformation des NIH3T3 alors que LEX-MET $\Delta 1$ Y13-16F en est incapable. Les cellules NIH3T3 ont été transfectées par 2 μ g/ml de vecteur d'expression vide (vecteur), ou exprimant LEX-MET $\Delta 1$ ou LEX-MET $\Delta 1$ Y13-16F. Les cellules ont été cultivées 18 jours en 5 % de sérum, puis ont été fixées et colorées.

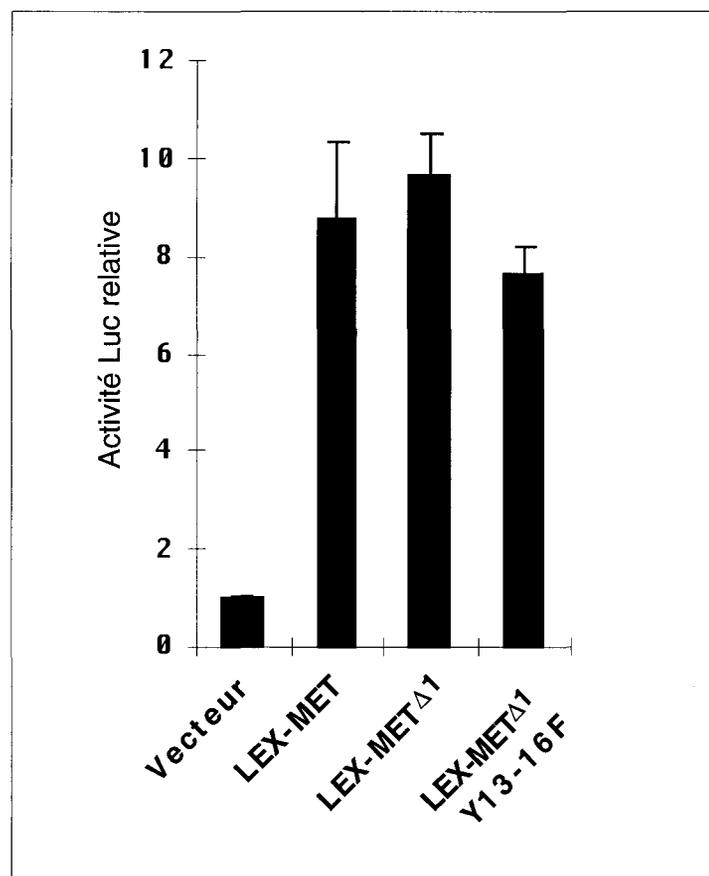


Figure 22 : Les fusions LEX-MET, LEX-MET $\Delta 1$ et LEX-MET $\Delta 1$ Y13-16F induisent la transactivation du gène indicateur EBS/AP1-Luc. Les cellules MDCK ont été co-transfectées transitoirement par 0,5 μ g/ml de gène indicateur EBS/AP1-Luc et 0,25 μ g/ml de vecteur d'expression vide (vecteur) ou exprimant les fusions LEX-MET, LEX-MET $\Delta 1$ ou LEX-MET $\Delta 1$ Y13-16F. L'activité luciférase a été mesurée 48 h après la transfection.

L'argument essentiel qui m'a orienté vers la région juxtamembranaire, était apporté par les résultats de D. Besser et ses collaborateurs, qui ont démontré que TPR-MET muté sur les résidus tyrosines C-terminaux était incapable d'induire la transactivation du promoteur de l'uPa (Besser et al., 1997), alors que dans nos mains la chimère TRK-MET mutée transactivait efficacement ce promoteur. Il est clair maintenant que l'absence du domaine juxtamembranaire sur TPR-MET ne permet pas d'expliquer la divergence des résultats obtenus par D. Besser et nous-même. Initialement, il a été démontré, par délétions progressives et par mutations ponctuelles sur le promoteur de l'uPa, que le site EBS/AP1 situé entre les bases -2446 à -2356 est suffisant pour induire une réponse transcriptionnelle efficace. C'est ce site, isolé du reste du promoteur, que nous avons utilisé pour nos tests de transactivation. D. Besser a utilisé quant à lui un fragment du promoteur de l'uPa d'environ 9 Kb. Or, il a montré que d'autres sites du promoteur sont importants pour la régulation de l'expression. Ainsi, un deuxième site EBS/AP1 fonctionnel a été caractérisé en position -6,9 Kb (D'Orazio et al., 1997). Il est clair qu'un élément de réponse isolé d'un promoteur ne peut pas mimer une séquence de plus de 9kb qui intégrera un plus grand nombre de régulation.

Néanmoins, nos résultats, démontrants que la transformation n'est plus possible alors que la transactivation l'est toujours, reste très intéressant. En effet, ils rejoignent joliment ceux obtenus sur les cellules épithéliales avec TRK-MET^{Y13-16F}, ou la morphogenèse n'est plus possible alors que la transactivation l'est toujours. Or ce sont ces résultats, qui nous ont permis de montrer que le site de fixation multisubstrat n'est indispensable ni pour l'activation de la voie RAS-ERK, ni pour la dispersion.

3) Perspectives

(a) Implication de la voie RAS-ERK dans la transformation

Si l'activation de la voie RAS-ERK, par la fusion LEX-MET ^{Δ1Y13-16F}, n'est pas suffisante pour induire la transformation, on peut se demander dans quelle mesure l'activation de cette voie est impliquée dans le phénotype de transformation ? On peut se demander également, quels phénotypes l'activation de cette cascade sera capable d'engendrer ?

Pour répondre à ses questions, nous sélectionnerons des clones de cellules NIH3T3 exprimant stablement les constructions LEX-MET ^{Δ1} et LEX-MET ^{Δ1Y13-16F}. En premier lieu, nous

vérifierons que les clones exprimant les fusions LEX-MET présentent bien une activation plus importante des MAPK ERK. En suite, sur les clones transformés exprimant LEX-MET^{Δ1}, le traitement par le PD98059, un inhibiteur des kinases MEK, nous permettra de connaître l'implication de la voie RAS-ERK dans la transformation. D'autre part, nous tenterons de déterminer le phénotype induit par l'expression stable de LEX-MET^{Δ1Y13-16F}. Puisque dans les fibroblastes l'activation de la voie RAS-ERK est généralement associée à la prolifération, nous nous intéresserons d'abord aux capacités prolifératives des clones.

(b) Poursuite de la cartographie du récepteur MET

La délétion de la partie juxtamembranaire, sur les fusions LEX-MET, nous indique que cette région n'est pas nécessaire pour la transactivation d'éléments de réponses à RAS. La poursuite de la cartographie fonctionnelle du récepteur garde donc tout son intérêt.

J'ai alors élargi les investigations en construisant d'autres fusions LEX-MET ; une fusion LEX-MET dépourvue d'extrémité C-terminale (LEX-MET^{Δ2}) et une construction sans domaine juxtamembranaire ni extrémité C-terminale (LEX-MET^{Δ1 Δ2}) (Figure 19). Il est intéressant de noter que ce type de délétion n'aurait pas pu être envisageable sans les anticorps anti-LEX, puisque les anticorps anti-MET sont dirigés contre l'extrémité C-terminale de la protéine. Ces constructions sont déjà clonées et elles permettent la production de protéines de fusion à la taille attendue (résultats non présentés).

Comme pour les fusions précédentes, nous vérifierons que les nouvelles constructions présentent une activité tyrosine kinase constitutivement activée. Les tests de transactivation nous permettront quant à eux une évaluation rapide de l'impact des délétions sur l'activation de la voie RAS-ERK. Dans l'éventualité où une fusion perdait ses capacités transactivatrices, nous réduirons le plus possible les délétions, pour cartographier le plus précisément possible le site responsable de l'activation. Nous garderons également à l'esprit les avantages importants qu'apportent les chimères TRK-MET, notamment pour évaluer l'impact des délétions dans les réponses biologiques comme la dispersion et la morphogénèse.

4) Matériels et méthodes

Immunofluorescence : Les cellules MDCK (15 000 cellules par puits en plaque 12 puits) ont été cultivées sur lamelles de verre et transfectées par les vecteurs exprimants les fusions LEX-MET, par la méthode de transfection à la lipofectamine. Les cellules ont été fixées en méthanol/acétone (1/1) pendant 5 minutes. Ensuite, les cellules ont été incubées pendant 30 minutes en tampon de blocage (0,2 % caséine dans du PBS), puis avec l'anticorps anti-LEXA, pendant 1 heure (4 µg/ml) (monoclonal, dirigé contre la région de liaison à l'ADN de LEXA, Santa Cruz). Après lavage en PBS, une incubation de 1 heure a été réalisée avec le second anticorps (4 µg/ml) (anti-immunoglobuline de souris conjugué à la FITC, DAKO). Une coloration nucléaire par le Hoechst 33258 a été effectuée lors du dernier bain en PBS, avant le montage sur lame.

Test de transformation par formation de foyers : Les cellules NIH3T3 (10⁶ cellules par boîte 100mm) ont été transfectées par les vecteurs exprimants les fusions LEX-MET, par la méthode de transfection à la lipofectamine, puis cultivées en 5% de sérum. 18 jours après la transfection, les cellules ont été fixées et colorées (diff-Quick, Dade).

Pour les autres types d'expériences, les matériels et méthodes sont détaillés dans les deux publications.



L'exemple d'une voie de signalisation



L'exemple d'un réseau. Ici, le système vasculaire de la tête

Figure 23

DISCUSSION GENERALE

1) Notion de réseau de signalisation

A la fois au cours de l'introduction et de mes résultats, j'ai été confronté au problème des mécanismes de transfert de l'information, qui permettent à un facteur donné d'induire une ou plusieurs réponses biologiques dans un même type cellulaire. Il est clair que nos connaissances ne sont pas assez étendues pour espérer reconstituer l'ensemble des événements du stimulus au phénotype, cependant il est possible de mettre en valeur quelques caractéristiques de la transmission du signal dans la cellule.

Une voie de signalisation permet la transmission de l'information d'un point A vers un point B. Selon cette considération, la voie RAS-ERK est un exemple très représentatif. Cependant, le récepteur MET est capable d'induire par de multiples mécanismes l'activation de la protéine RAS. Ainsi, le complexe GRB2-SOS, permettant l'activation de RAS, peut être recruté directement par MET ou indirectement par SHC. De plus, nous avons montré que sans le recrutement de ces deux protéines, MET est toujours capable d'activer la voie RAS-ERK. D'autre part, les voies en aval de RAS sont également multiples et permettent souvent l'activation de voies, que MET est déjà capable d'activer. Ainsi, les voies de signalisation sont donc non seulement multiples, mais aussi connectées les unes avec les autres. Dans ces conditions la notion de voie de signalisation doit être remplacée par celle de réseau de signalisation (Figure 23). Il est clair que les ramifications du réseau assurent le cheminement des informations vers différents lieux de la cellule. Les interconnexions pourraient permettre, quant à elles, suite à l'activation d'une voie de signalisation, l'activation en relais de nombreuses autres voies. Ainsi la transmission efficace de l'ensemble des informations serait facilitée.

2) Les nœuds nécessaires à la transduction du signal

Au sein de ce réseau, des nœuds ou carrefours sont nécessaires au passage de l'information. Les premiers nœuds se situent sur le récepteur MET lui-même. Il s'agit notamment des résidus tyrosines 14 et 15. En effet, de nombreuses protéines à la base de voies de signalisation sont recrutées par ce site. De plus, leurs mutations abolissent la morphogénèse de branchement.

Notre travail démontre que le récepteur MET médie également l'information par d'autres sites qui sont suffisants pour induire l'activation de la voie RAS-ERK et la dispersion des cellules épithéliales. Bien que ces sites nécessaires à la transduction de l'information ne soient pas encore identifiés, les mécanismes mis en jeu pourraient être originaux. En effet, comme le montre les exemples récents d'autres récepteurs tyrosines kinases, les résidus tyrosines ne sont pas toujours impliqués dans l'activation des voies de signalisation. La cartographie fonctionnelle du récepteur MET que nous avons engagée, semble dès lors un enjeu important.

Les nœuds nécessaires à la transduction du signal se situent également au niveau des effecteurs de MET. Il s'agit des adaptateurs SHC et GAB1 qui, bien que leur fonction de recrutement de protéines cytoplasmiques soit redondante, jouent un rôle crucial pour une transmission efficace de l'information. Dans le cas particulier du récepteur MET, le rôle de ces adaptateurs pourrait être encore plus important. En effet comme nous l'avons vu, MET recrute la grande majorité de ses effecteurs sur une région très restreinte. La mise en jeu d'adaptateurs, capables à eux seuls de lier sur différentes tyrosines de multiples protéines, pourrait alors être essentielle pour une activation efficace de l'ensemble des voies de signalisation.

Il s'agit encore de protéines dont l'activation est directement liée à celle du récepteur, comme RAS, la PI3K, SRC ou STAT3, ou de protéines situées plus en aval comme les kinases ERK. Ces protéines sont impliquées très tôt dans la transmission de l'information et elles sont capables d'activer en aval de nombreux autres événements. Il apparaît donc logique que leur activité soit nécessaire à la réponse finale.

Nos études suggèrent qu'il existerait de nouveaux partenaires pour le récepteur MET. Leur identification revêt également un enjeu important. En effet, ces partenaires pourraient être impliqués dans l'activation de la voie RAS-ERK, qui est nécessaire aux réponses biologiques, mais pourraient également être à la base de nouvelles voies de signalisation.

3) Les différents niveaux de complexité

Les ramifications et les interconnexions du réseau de signalisation rendent difficile la compréhension du cheminement de l'information. Néanmoins, ce premier niveau de complexité ne doit pas, pour autant, en faire oublier d'autres. Par exemple, la dispersion nécessite, entre autre, la réorganisation du réseau d'actine, la perte des jonctions intercellulaires et la néo-

synthèse de protéines. Or, ces différents événements ont une organisation séquentielle dans le temps. Ainsi, le réseau de signalisation doit non seulement permettre la transduction de l'information vers différents points de la cellule, mais il doit également induire ces événements selon une chronologie précise. De plus, le niveau d'activation des voies doit également être régulé finement. Par exemple, la formation spontanée de structures branchées en gel de collagène n'a pu être obtenue qu'en activant RAS, tout en inhibant en aval les kinases ERK.

4) Intégration du signal

La dispersion induite par l'HGF/SF sur les cellules MDCK, nécessite au minimum 12 heures, la morphogénèse sur matrigel 24 heures et la morphogénèse de branchement en gel de collagène peut s'étaler sur plus de 15 jours. Or, les mécanismes de signalisation que nous avons décrits et étudiés se déroulent dans une toute autre échelle de temps. La phosphorylation du récepteur, suite à l'activation par l'HGF/SF, est quasiment instantanée et le recrutement des partenaires se produit dans la foulée. La phosphorylation des kinases ERK qui permettent notamment de tisser un lien du cytoplasme vers le noyau, est détectable dès la première minute de stimulation. On est loin des 15 jours nécessaires pour la morphogénèse ! Ainsi, les voies de signalisation sont des processus précoces qui sont les points de départ d'autres événements plus tardifs. En d'autres termes, pour qu'une voie de signalisation conduise à une réponse biologique, l'information doit être intégrée par la cellule. Or, il faut admettre que les liens entre les voies de signalisation et les événements plus tardifs sont loin d'être élucidés.

Pourtant, les auteurs cherchent par l'analyse des voies de signalisation à mieux comprendre les réponses biologiques. L'exemple de la dispersion et de la morphogénèse induites par l'HGF/SF est représentatif. En effet, les études ont cherché à décrypter les voies nécessaires pour l'une ou l'autre des réponses. De manière générale, les deux réponses nécessitent les mêmes voies de signalisation, suggérant que la dispersion et la morphogénèse nécessite les mêmes compétences. Cependant, tout les travaux sur la signalisation de l'HGF/SF indiquent qu'à chaque fois que des perturbations des voies de signalisation inhibent la dispersion, la morphogénèse est perdue. Dans ces conditions, il semble que la dispersion soit une étape nécessaire à la morphogénèse. On peut alors se demander, si la morphogénèse nécessite des voies de signalisation spécifiques. La caractérisation de STAT3, dont l'activation est indispensable pour la

morphogenèse mais pas pour la dispersion, semble conforter le modèle selon lequel la morphogenèse nécessite des compétences spécifiques.

Cependant, même si le décryptage des réseaux de signalisation est de plus en plus avancé, il va sans dire que la compréhension de la transformation par une cellule, d'un stimulus en réponse biologique complexe est loin d'être achevée.

Références bibliographiques

Albagli, O., Soudant, N., Ferreira, E., Dhordain, P., Dewitte, F., Begue, A., Flourens, A., Stehelin, D., and Leprince, D. (1994). A model for gene evolution of the ets-1/ets-2 transcription factors based on structural and functional homologies. *Oncogene* 9, 3259-71.

Alessi, D. R., Saito, Y., Campbell, D. G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C. J., and Cowley, S. (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *Embo J* 13, 1610-9.

Bardelli, A., Longati, P., Albero, D., Goruppi, S., Schneider, C., Ponzetto, C., and Comoglio, P. M. (1996). HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *Embo J* 15, 6205-12.

Bardelli, A., Longati, P., Gramaglia, D., Stella, M. C., and Comoglio, P. M. (1997). Gab1 coupling to the HGF/Met receptor multifunctional docking site requires binding of Grb2 and correlates with the transforming potential. *Oncogene* 15, 3103-11.

Bardelli, A., Pugliese, L., and Comoglio, P. M. (1997). "Invasive-growth" signaling by the Met/HGF receptor: the hereditary renal carcinoma connection. *Biochim Biophys Acta* 1333, M41-51.

Barton, K., Muthusamy, N., Fischer, C., Ting, C. N., Walunas, T. L., Lanier, L. L., and Leiden, J. M. (1998). The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity* 9, 555-63.

Behrens, J., Mareel, M. M., Van Roy, F., and Birchmeier, W. (1989). Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of ovomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* 108, 2435-2447.

Behrens, J., Vakaet, L., Friis, R., Winterhager, E., Van Roy, F., Mareel, M. M., and Birchmeier, W. (1993). Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol* 120, 757-66.

Besser, D., Bardelli, A., Didichenko, S., Thelen, M., Comoglio, P. M., Ponzetto, C., and Nagamine, Y. (1997). Regulation of the urokinase-type plasminogen activator gene by the oncogene Tpr-Met involves GRB2. *Oncogene* 14, 705-11.

Bhat, N. K., Komschlies, K. L., Fujiwara, S., Fisher, R. J., Mathieson, B. J., Gregorio, T. A., Young, H. A., Kasik, J. W., Ozato, K., and Papas, T. S. (1989). Expression of ets genes in mouse thymocyte subsets and T cells. *J. Immunol.* 142, 672-678.

Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., and Birchmeier, C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud [see comments]. *Nature* 376, 768-71.

Boccaccio, C., Ando, M., Tamagnone, L., Bardelli, A., Michieli, P., Battistini, C., and Comoglio, P. M. (1998). Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* 391, 285-8.

Boccaccio, C., Gaudino, G., Gambarotta, G., Galimi, F., and Comoglio, P. M. (1994). Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression is inducible and is part of the delayed-early response to HGF. *J Biol Chem* 269, 12846-51.

Bolon, I., Gouyer, V., Devouassoux, M., Vandebunder, B., Wernert, N., Moro, D., Brambilla, C., and Brambilla, E. (1995). Expression of c-ets-1, collagenase 1, and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas. *Am J Pathol* 147, 1298-310.

Bonfini, L., Migliaccio, E., Pelicci, G., Lanfrancone, L., and Pelicci, P. (1996). Not all shc's roads lead to ras. *Trends Biochem Sci* 21, 257-261.

Bories, J. C., Willerford, D. M., Grevin, D., Davidson, L., Camus, A., Martin, P., Stehelin, D., and Alt, F. W. (1995). Increased t-cell apoptosis and terminal b-cell differentiation induced by inactivation of the ets-1 proto-oncogene. *Nature* 377, 635-638.

Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Faletto, D. L., Chan, A. M., Kmieciak, T. E., Vande, W. G., and Aaronson, S. A. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251, 802-4.

Boyer, B., Roche, S., Denoyelle, M., and Thiery, J. P. (1997). Src and Ras are involved in separate pathways in epithelial cell scattering. *Embo J* 16, 5904-13.

Brinkmann, V., Foroutan, H., Sachs, M., Weidner, K. M., and Birchmeier, W. (1995). Hepatocyte growth factor scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *J Cell Biol* 131, 1573-1586.

Brunner, D., Dücker, K., Oellers, N., Hafen, E., Scholz, H., and Klämbt, C. (1994). The ETS domain protein Pointed-P2 is a target of MAP kinase in the Sevenless signal transduction pathway. *Nature* 370, 386-389.

Buday, L., and Downward, J. (1993). Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73, 611-20.

Bussolino, F., Di, R. M., Ziche, M., Bocchietto, E., Olivero, M., Naldini, L., Gaudino, G., Tamagnone, L., Coffey, A., and Comoglio, P. M. (1992). Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 119, 629-41.

Castagnino, P., Soriano, J. V., Montesano, R., and Bottaro, D. P. (1998). Induction of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 is a delayed early cellular response to hepatocyte growth factor. *Oncogene* 17, 481-92.

Chan, A. M., Rubin, J. S., Bottaro, D. P., Hirschfield, D. W., Chedid, M., and Aaronson, S. A. (1991). Identification of a competitive HGF antagonist encoded by an alternative transcript. *Science* 254, 1382-5.

Chardin, P., Camonis, J. H., Gale, N. W., van, A. L., Schlessinger, J., Wigler, M. H., and Bar, S. D. (1993). Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 260, 1338-43.

Chen, Z., Fisher, R. J., Riggs, C. W., Rhim, J. S., and Lautenberger, J. A. (1997). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by ETS1 antisense oligonucleotides. *Cancer Res* 57, 2013-9.

Chotteau-Lelievre, A., Desbiens, X., Pelczar, H., Defosse, P. A., and de Launoit, Y. (1997). Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development. *Oncogene* 15, 937-52.

Claesson-Welsh, L. (1994). Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem* 269, 32023-6.

Comoglio, P., and Boccaccio, C. (1996). The HGF receptor family: unconventional signal transducers for invasive cell growth. *Genes to Cells* 1, 347-354.

Cooper, C. S., Park, M., Blair, D. G., Tainsky, M. A., Huebner, K., Croce, C. M., and Vande Woude, G. F. (1984). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 311, 29-33.

Crepieux, P., Coll, J., and Stehelin, D. (1995). Ets family of proteins : weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners. *Critic. Rev. Oncogen. in press*.

Crews, C. M., and Erikson, R. L. (1992). Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast *byr1* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8205-9.

Delannoy-Courdent, A., Fauquette, W., Dong-Le Bourhis, X. F., Boilly, B., Vandebunder, B., and Desbiens, X. (1996). Expression of c-ets-1 and uPA genes is associated with mammary epithelial cell tubulogenesis or neoplastic scattering. *Int J Dev Biol* 40, 1097-108.

Delannoy-Courdent, A., Mattot, V., Fafeur, V., Fauquette, W., Pollet, I., Calmels, T., Vercamer, C., Boilly, B., Vandebunder, B., and Desbiens, X. (1998). The expression of an Ets1 transcription factor lacking its activation domain decreases uPA proteolytic activity and cell motility, and impairs normal tubulogenesis and cancerous scattering in mammary epithelial cells. *J Cell Sci* 111, 1521-34.

Dérijard, B., Hibi, M., Wu, I.-H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and J.Dadis, R. (1994). JNK: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-1037.

Desbiens, X., Quéva, C., Jaffredo, T., Stéhelin, D., and Vandembunder, B. (1991). The relationship between cell proliferation and the transcription of the nuclear oncogenes c-myc, c-myb and c-ets-1 during feather morphogenesis in the chick embryo. *Development* 111, 699-713.

Dhordain, P., Dewitte, F., Desbiens, X., Stéhelin, D., and Duterque-Coquillaud, M. (1995). Mesodermal expression of the chicken *erg* gene associated with precartilaginous condensation and cartilage differentiation. *Mechanisms of Dev. In Press*.

Di Renzo, M. F., Olivero, M., Katsaros, D., Crepaldi, T., Gaglia, P., Zola, P., Sismondi, P., and Comoglio, P. M. (1994). Overexpression of the Met/HGF receptor in ovarian cancer. *Int J Cancer* 58, 658-62.

Donaldson, L. W., Petersen, J. M., Graves, B. J., and McIntosh, L. P. (1996). Solution structure of the ETS domain from murine *ets-1*: a winged helix-turn-helix DNA binding motif. *EMBO J* 15, 125-134.

D'Orazio, D., Besser, D., Marksitzer, R., Kunz, C., Hume, D. A., Kiefer, B., and Nagamine, Y. (1997). Cooperation of two PEA3/AP1 sites in uPA gene induction by TPA and FGF-2. *Gene* 201, 179-87.

Dunsmore, S. E., Rubin, J. S., Kovacs, S. O., Chedid, M., Parks, W. C., and Welgus, H. G. (1996). Mechanisms of hepatocyte growth factor stimulation of keratinocyte metalloproteinase production. *J Biol Chem* 271, 24576-24582.

Egan, S. E., Giddings, B. W., Brooks, M. W., Buday, L., Sizeland, A. M., and Weinberg, R. A. (1993). Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation [see comments]. *Nature* 363, 45-51.

Fafeur, V., Tulasne, D., Queva, C., Vercamer, C., Dimster, V., Mattot, V., Stéhelin, D., Desbiens, X., and Vandembunder, B. (1997). The ETS1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter factor-stimulated MDCK epithelial cells. *Cell Growth Differ* 8, 655-65.

Ferracini, R., Longati, P., Naldini, L., Vigna, E., and Comoglio, P. M. (1991). Identification of the major autophosphorylation site of the Met/hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 266, 19558-64.

Fialka, I., Schwarz, H., Reichmann, E., Oft, M., Busslinger, M., and Beug, H. (1996). The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. *J Cell Biol* 132, 1115-32.

Fisher, R. J., Fivash, M., Casas-Finet, J., Erickson, J. W., Kondoh, A., Bladen, S. V., Fisher, C., Watson, D. K., and Papas, T. S. (1994). Real-time DNA binding measurement of the Ets-

recombinant oncoproteins reveal significant kinetic differences between the p42 and p51 isoforms. *Protein Science* 3, 257-266.

Fixman, E. D., Fournier, T. M., Kamikura, D. M., Naujokas, M. A., and Park, M. (1996). Pathways downstream of *shc* and *grb2* are required for cell transformation by the Tpr-Met oncoprotein. *J Biol Chem* 271, 13116-13122.

Fixman, E. D., Naujokas, M. A., Rodrigues, G. A., Moran, M. F., and Park, M. (1995). Efficient cell transformation by the Tpr-Met oncoprotein is dependent upon tyrosine 489 in the carboxy-terminus. *Oncogene* 10, 237-49.

Fournier, T. M., Kamikura, D., Teng, K., and Park, M. (1996). Branching tubulogenesis but not scatter of Madin-Darby canine kidney cells requires a functional *grb2* binding site in the met receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 271, 22211-22217.

Fowles, L. F., Martin, M. L., Nelsen, L., Stacey, K. J., Redd, D., Clark, Y. M., Nagamine, Y., McMahon, M., Hume, D. A., and Ostrowski, M. C. (1998). Persistent activation of mitogen-activated protein kinases p42 and p44 and *ets-2* phosphorylation in response to colony-stimulating factor 1/c- *fms* signaling. *Mol Cell Biol* 18, 5148-56.

Gambarotta, G., Boccaccio, C., Giordano, S., Ando, M., Stella, M. C., and Comoglio, P. M. (1996). *Ets* up-regulates MET transcription. *Oncogene* 13, 1911-1917.

Gaudino, G., Follenzi, A., Naldini, L., Collesi, C., Santoro, M., Gallo, K. A., Godowski, P. J., and Comoglio, P. M. (1994). RON is a heterodimeric tyrosine kinase receptor activated by the HGF homologue MSP. *Embo J* 13, 3524-32.

Gégonne, A., Bosselut, R., Bailly, R. A., and Ghysdael, J. (1993). Synergistic activation of the HTLV1 LTR *Ets*-responsive region by transcription factors *Ets1* and *Sp1*. *EMBO J.* 12, 1169-1178.

Ghysdael, J., Gegonne, A., Pognonec, P., Dernis, D., Leprince, D., and Stehelin, D. (1986). Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a *c-ets* oncogene-encoded Mr 54,000 cytoplasmic protein. *Proc. Natl. Acad. USA* 83, 1714-1718.

Golub, T. R., Barker, G. F., Lovett, M., and Gilliland, D. G. (1994). Fusion of PDGF receptor beta to a novel *ets*-like gene, *tel*, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 77, 307-16.

Gonzatti-Haces, M., Seth, A., Park, M., Copeland, T., Oroszlan, S., and Van de Woude, G. F. (1988). Characterisation of TPR-MET oncogene p65 and the MET protooncogene p140 protein-tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 21-25.

Graf, T., Oker-Blom, N., Todorov, T. G., and Beug, H. (1979). Transforming capacities and defectiveness of avian leukemia viruses OK10 and E 26. *Virology* 99, 431-6.

Graziani, A., Gramaglia, D., Cantley, L. C., and Comoglio, P. M. (1991). The tyrosine-phosphorylated hepatocyte growth factor/scatter factor receptor associates with phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 266, 22087-90.

Graziani, A., Gramaglia, D., dalla Zonca, P., and Comoglio, P. M. (1993). Hepatocyte growth factor/scatter factor receptor stimulates the ras-guanine nucleotide exchanger. *J. Biol. Chem.* 268, 9165-9168.

Gutman, A., and Wasylyk, B. (1990). The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J.*, 2241-2246.

Hadari, Y. R., Kouhara, H., Lax, I., and Schlessinger, J. (1998). Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Mol Cell Biol* 18, 3966-73.

Hagman, J., and Grosschedl, R. (1992). An inhibitory carboxyl-terminal domain in Ets-1 and Ets-2 mediates differential binding of ETS family factors to promoter sequences of the mb-1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8889-93.

Hartmann, G., Weidner, K. M., Schwarz, H., and Birchmeier, W. (1994). The motility signal of scatter factor/hepatocyte growth factor mediated through the receptor tyrosine kinase Met requires intracellular action of ras. *J. Biol. Chem.* 269, 21936-21939.

Harvey, P., Warn, A., Newman, P., Perry, L. J., Ball, R. Y., and Warn, R. M. (1996). Immunoreactivity for hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, met, in human lung carcinomas and malignant mesotheliomas. *J Pathol* 180, 389-94.

Hawkins, P. T., Eguinoa, A., Qiu, R. G., Stokoe, D., Cooke, F. T., Walters, R., Wennstrom, S., Claesson-Welsh, L., Evans, T., Symons, M., and et al. (1995). PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol* 5, 393-403.

Hayman, M. J., Kitchener, G., Vogt, P. K., and Beug, H. (1985). The putative transforming protein of S13 avian erythroblastosis virus is a transmembrane glycoprotein with an associated protein kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8237-41.

Heldin, C. H. (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80, 213-23.

Holgado, M. M., Emllet, D. R., Moscatello, D. K., Godwin, A. K., and Wong, A. J. (1996). A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature* 379, 560-4.

Hubbard, S. R., Mohammadi, M., and Schlessinger, J. (1998). Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 273, 11987-90.

Huff, J. L., Jelinek, M. A., Borgman, C. A., Lansing, T. J., and Parsons, J. T. (1993). The protooncogene *c-sea* encodes a transmembrane protein-tyrosine kinase related to the Met/hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 6140-4.

Iwasaka, C., Tanaka, K., Abe, M., and Sato, Y. (1996). Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase- type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* *169*, 522-31.

Jindo, T., Tsuboi, R., Imai, R., Takamori, K., Rubin, J. S., and Ogawa, H. (1995). The effect of hepatocyte growth factor/scatter factor on human hair follicle growth. *J Dermatol Sci* *10*, 229-32.

Johnson, M., Koukoulis, G., Kochhar, K., Kubo, C., Nakamura, T., and Iyer, A. (1995). Selective tumorigenesis in non-parenchymal liver epithelial cell lines by hepatocyte growth factor transfection. *Cancer Lett* *96*, 37-48.

Joneson, T., White, M. A., Wigler, M. H., and Bar, S. D. (1996). Stimulation of membrane ruffling and MAP kinase activation by distinct effectors of RAS. *Science* *271*, 810-2.

Jonsen, M. D., Petersen, J. M., Xu, Q. P., and Graves, B. J. (1996). Characterization of the cooperative function of inhibitory sequences in *ets-1*. *Mol Cell Biol* *16*, 2065-2073.

Jousset, C., Carron, C., Boureux, A., Quang, C. T., Oury, C., Dusanter-Fourt, I., Charon, M., Levin, J., Bernard, O., and Ghysdael, J. (1997). A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein. *Embo J* *16*, 69-82.

Kamikura, D. M., Naujokas, M. A., and Park, M. (1996). Identification of tyrosine 489 in the carboxy terminus of the Tpr-Met oncoprotein as a major site of autophosphorylation. *Biochemistry* *35*, 1010-1017.

Kanda, H., Tajima, H., Lee, G. H., Nomura, K., Ohtake, K., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Kitagawa, T. (1993). Hepatocyte growth factor transforms immortalized mouse liver epithelial cells. *Oncogene* *8*, 3047-53.

Khwaja, A., Lehmann, K., Marte, B. M., and Downward, J. (1998). Phosphoinositide 3-kinase induces scattering and tubulogenesis in epithelial cells through a novel pathway. *J Biol Chem* *273*, 18793-801.

Kochhar, K. S., and Iyer, A. P. (1996). Hepatocyte growth factor induces activation of Nck and phospholipase C-gamma in lung carcinoma cells. *Cancer Letters* *104*, 163-169.

Kodandapani, R., Pio, F., Ni, C. Z., Piccialli, G., Klemsz, M., McKercher, S., Maki, R. A., and Ely, K. R. (1996). A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS-domain-DNA complex [published erratum appears in *Nature* 1998 Apr 9;392(6676):630]. *Nature* *380*, 456-60.

Koizumi, S., Fisher, R. J., Fujiwara, S., Jorcyk, C., Bhat, N. K., Seth, A., and Papas, T. S. (1990). Isoforms of the human *ets-1* protein: generation by alternative splicing and differential phosphorylation. *Oncogene* 5, 675-681.

Komada, M., and Kitamura, N. (1993). The cell dissociation and motility triggered by scatter factor/hepatocyte growth factor are mediated through the cytoplasmic domain of the c-Met receptor. *Oncogene* 8, 2381-90.

Komada, M., and Kitamura, N. (1994). Regulatory role a major tyrosine autophosphorylation site of kinase domain of c-Met receptor (scatter factor/hepatocyte growth factor receptor). *J. Biol. Chem.* 269, 16131-16136.

Kouhara, H., Hadari, Y. R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., and Schlessinger, J. (1997). A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* 89, 693-702.

Laudet, V., Hanni, C., Stehelin, D., and Duterque-Coquillaud, M. (1999). Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene* 18, 1351-9.

Leaman, D. W., Leung, S., Li, X., and Stark, G. R. (1996). Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines. *Faseb J* 10, 1578-88.

Lee, C., and Yamada, K. M. (1994). Alternatively spliced juxtamembrane domain of a tyrosine kinase receptor is a multifunctional regulatory site. *J. Biol. Chem.* 270, 507-510.

Lee, C. C., and Yamada, K. M. (1995). Alternatively spliced juxtamembrane domain of a tyrosine kinase receptor is a multifunctional regulatory site. Deletion alters cellular tyrosine phosphorylation pattern and facilitates binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to the hepatocyte growth factor receptor. *J Biol Chem* 270, 507-10.

Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemain, G., Brunet, A., and Pouyssegur, J. (1993). Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol* 122, 1079-88.

Leprince, D., Gégonne, A., Coll, J., de, T. C., Schneeberger, A., Lagrou, C., and Stehelin, D. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 306, 395-397.

Lim, F., Kraut, N., Frampton, J., and Graft, T. (1992). DNA binding by a c-ets1, but not v-ets, repressed by an intramolecular mechanism. *EMBO J* 11, 643-652.

Lin, H. Y., Xu, J., Ischenko, I., Ornitz, D. M., Haleboua, S., and Hayman, M. J. (1998). Identification of the cytoplasmic regions of fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 which play important roles in induction of neurite outgrowth in PC12 cells by FGF-1. *Mol Cell Biol* 18, 3762-70.

Lokker, N. A., Mark, M. R., Luis, E. A., Bennett, G. L., Robbins, K. A., Baker, J. B., and Godowski, P. J. (1992). Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *Embo J* 11, 2503-10.

Longati, P., Bardelli, A., Ponzetto, C., Naldini, L., and Comoglio, P. M. (1994). Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* 9, 49-57.

Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar, S. D., and Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70, 431-42.

Maina, F., Casagrande, F., Audero, E., Simeone, A., Comoglio, P. M., Klein, R., and Ponzetto, C. (1996). Uncoupling of grb2 from the met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* 87, 531-542.

Mareel, M., De Baetselier, P., and Van Roy, F. (1991). Mechanisms of invasion and metastasis. CRC, Press.

Maroun, C. R., Holgado-Madruga, M., Royal, I., Naujokas, M. A., Fournier, T. M., Wong, A. J., and Park, M. (1999). The Gab1 PH domain is required for localization of Gab1 at sites of cell-cell contact and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 19, 1784-99.

Matsumoto, K., Kagoshima, M., and Nakamura, T. (1995). Hepatocyte growth factor as a potent survival factor for rat pheochromocytoma PC12 cells. *Exp Cell Res* 220, 71-8.

Matsumoto, K., and Nakamura, T. (1996). Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J. Biochem.* 119, 591-600.

Mattot, V., Raes, M. B., Henriët, P., Eeckhout, Y., Stéhelin, D., Vandenbunder, B., and Desbiens, X. (1995). Expression of interstitial collagenase is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis. *J. Cell Sci.* 108, 529-535.

Mattot, V., Vercamer, C., Soncin, F., Calmels, T., Huguet, C., Fafeur, V., and Vandenbunder, B. (soumis). Constitutive expression of the DNA-binding domain of Ets1 increases endothelial cell adhesion and stimulates their organisation into capillary-like structures.

McCarthy, S. A., Chen, D., Yang, B. S., Garcia Ramirez, J. J., Cherwinski, H., Chen, X. R., Klagsbrun, M., Hauser, C. A., Ostrowski, M. C., and McMahon, M. (1997). Rapid phosphorylation of Ets-2 accompanies mitogen-activated protein kinase activation and the induction of heparin-binding epidermal growth factor gene expression by oncogenic Raf-1. *Mol Cell Biol* 17, 2401-12.

McCawley, L. J., Li, S., Wattenberg, E. V., and Hudson, L. G. (1999). Sustained activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. A mechanism underlying receptor tyrosine kinase specificity for matrix metalloproteinase-9 induction and cell migration. *J Biol Chem* 274, 4347-53.

McCawley, L. J., O'Brien, P., and Hudson, L. G. (1998). Epidermal growth factor (EGF)- and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF)- mediated keratinocyte migration is coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9. *J Cell Physiol* 176, 255-65.

McCormick, F., and Wittinghofer, A. (1996). Interactions between Ras proteins and their effectors. *Curr Opin Biotechnol* 7, 449-56.

Metz, T., and Graf, T. (1991). Fusion of the nuclear oncoproteins v-Myb and v-Ets is required for the leukemogenicity of E26 virus. *Cell* 66, 95-105.

Migliaccio, E., Mele, S., Salcini, A. E., Pelicci, G., Lai, K. M., Superti, F. G., Pawson, T., Di, F. P., Lanfrancone, L., and Pelicci, P. G. (1997). Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *Embo J* 16, 706-16.

Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Derijard, B., Davis, R. J., Johnson, G. L., and Karin, M. (1994). Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* 266, 1719-23.

Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y., and Kitamura, N. (1993). Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *J Biol Chem* 268, 10024-8.

Mizuno, K., Tanoue, Y., Okano, I., Harano, T., Takada, K., and Nakamura, T. (1994). Purification and characterization of hepatocyte growth factor (HGF)- converting enzyme: activation of pro-HGF. *Biochem Biophys Res Commun* 198, 1161-9.

Mohammadi, M., Dikic, I., Sorokin, A., Burgess, W. H., Jaye, M., and Schlessinger, J. (1996). Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 16, 977-89.

Montesano, R., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Orci, L. (1991). Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* 67, 901-908.

Moodie, S. A., Willumsen, B. M., Weber, M. J., and Wolfman, A. (1993). Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase [see comments]. *Science* 260, 1658-61.

Morrison, D. K., Heidecker, G., Rapp, U. R., and Copeland, T. D. (1993). Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *J Biol Chem* 268, 17309-16.

Muthusamy, N., Barton, K., and Leiden, J. M. (1995). Defective activation and survival of T cells lacking the ets-1 transcription factor. *Nature* 377, 639-642.

Nakamura, T., Nawa, K., and Ichihara, A. (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 122, 1450-9.

Naldini, L., Vigna, E., Narsimhan, R. P., Gaudino, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G. K., and Comoglio, P. M. (1991). Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 6, 501-4.

Naldini, L., Weidner, K. M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C., Narsimhan, R. P., Hartmann, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G. K., and et, a. l. (1991). Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *Embo J* 10, 2867-78.

Natali, P. G., Prat, M., Nicotra, M. R., Bigotti, A., Olivero, M., Comoglio, P. M., and Di Renzo, M. F. (1996). Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 69, 212-7.

Nguyen, L., Holgado, M. M., Maroun, C., Fixman, E. D., Kamikura, D., Fournier, T., Charest, A., Tremblay, M. L., Wong, A. J., and Park, M. (1997). Association of the multisubstrate docking protein Gab1 with the hepatocyte growth factor receptor requires a functional Grb2 binding site involving tyrosine 1356. *J. Biol. Chem.* 272, 20811-9.

Nunn, M. F., Seeburg, P. H., Moscovici, C., and Duesberg, P. H. (1983). Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* 306, 391-395.

Nye, J. A., Petersen, J. M., Gunther, C. V., Jonsen, M. D., and Graves, B. J. (1992). Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes Dev* 6, 975-90.

Ohmichi, H., Koshimizu, U., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (1998). Hepatocyte growth factor (HGF) acts as a mesenchyme-derived morphogenic factor during fetal lung development. *Development* 125, 1315-24.

Okigaki, M., Komada, M., Uehara, Y., Miyazawa, K., and Kitamura, N. (1992). Functional characterization of human hepatocyte growth factor mutants obtained by deletion of structural domains. *Biochemistry* 31, 9555-61.

Olivero, M., Rizzo, M., Madeddu, R., Casadio, C., Pennacchietti, S., Nicotra, M. R., Prat, M., Maggi, G., Arena, N., Natali, P. G., Comoglio, P. M., and Di Renzo, M. F. (1996). Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 74, 1862-8.

O'Neill, E. M., Rebay, I., Tjian, R., and Rubin, G. M. (1994). The activities of two Ets-related transcription factors required for drosophila eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell* 78, 137-147.

Paumelle, R., Tulasne, D., kherrouche, Z., Plaza, S., Vandebunder, B., and Fafeur, V. (manuscript en préparation). Common activation of the ERK and JNK kinases by SF/HGF can lead to opposite effects on a RAS-dependent transcriptional response in MDCK epithelial cells.

Pelicci, G., Giordano, S., Zhen, Z., Salcini, A. E., Lanfrancone, L., Bardelli, A., Panayotou, G., Waterfield, M. D., Ponzetto, C., Pelicci, P. G., and et, a. l. (1995). The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein. *Oncogene* 10, 1631-8.

Pelicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Grignani, F., Pawson, T., and Pelicci, P. G. (1992). A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 70, 93-104.

Peng, X., Greene, L. A., Kaplan, D. R., and Stephens, R. M. (1995). Deletion of a conserved juxtamembrane sequence in Trk abolishes NGF-promoted neuritogenesis. *Neuron* 15, 395-406.

Pepper, M. S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Orci, L., and Montesano, R. (1992). Hepatocyte growth factor increases urokinase-type plasminogen activator (u-PA) and u-PA receptor expression in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 267, 20493-20496.

Petersen, J. M., Skalicky, J. J., Donaldson, L. W., Mcintosh, L. P., Alber, T., and Graves, B. J. (1995). Modulation of transcription factor ets-1 DNA binding: DNA-induced unfolding of an alpha helix. *Science* 269, 1866-1869.

Pisters, L. L., Troncoso, P., Zhau, H. E., Li, W., von Eschenbach, A. C., and Chung, L. W. (1995). c-met proto-oncogene expression in benign and malignant human prostate tissues. *J Urol* 154, 293-8.

Pognonec, P., Boulukos, K. E., Gesquière, J. C., Stéhelin, D., and Ghysdael, J. (1988). Mitogenic stimulation of thymocytes results in the calcium-dependent phosphorylation of c-ets-1 proteins. *EMBO J* 7, 977-983.

Polverini, P. J., and Nickoloff, B. J. (1995). Role of scatter factor and the c-met protooncogene in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Adv Cancer Res* 66, 235-53.

Ponzetto, C., Bardelli, A., Maina, F., Longati, P., Panayotou, G., Dhand, R., Waterfield, M. D., and Comoglio, P. M. (1993). A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4600-4608.

Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graaziani, A., Panayotou, G., and Comoglio, P. M. (1994). A multifunctional docking site mediates signaling

and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77, 261-271.

Ponzetto, C., Zhen, Z., Audero, E., Maina, F., Bardelli, A., Basile, M. L., Giordano, S., Narsimhan, R., and Comoglio, P. (1996). Specific uncoupling of GRB2 from the met receptor - differential effects on transformation and motility. *J. Biol. Chem.* 271, 14119-14123.

Potempa, S., and Ridley, A. J. (1998). Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol Biol Cell* 9, 2185-200.

Pronk, G. J., de V., Smits, A. M., Buday, L., Downward, J., Maassen, J. A., Medema, R. H., and Bos, J. L. (1994). Involvement of Shc in insulin- and epidermal growth factor-induced activation of p21ras. *Mol Cell Biol* 14, 1575-81.

Quéva, C., Leprince, D., Stehelin, D., and Vandebunder, B. (1993). p54^{c-ets-1} and p68^{c-ets-1}, the two transcription factors encoded by the c-ets-1 locus, are differentially expressed during the development of the chick embryo. *Oncogene* 8, 2511-2520.

Rabault, B., and Ghysdael, J. (1994). Calcium-induced phosphorylation of ETS1 inhibits its specific DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* 269, 28143-28151.

Rabault, B., Roussel, M. F., Quang, C. T., and Ghysdael, J. (1996). Phosphorylation of ets1 regulates the complementation of a CSF-1 receptor impaired in mitogenesis. *Oncogene* 13, 877-881.

Rabin, S. J., Cleghon, V., and Kaplan, D. R. (1993). SNT, a differentiation-specific target of neurotrophic factor-induced tyrosine kinase activity in neurons and PC12 cells. *Mol Cell Biol* 13, 2203-13.

Reichmann, E., Schwarz, H., Deiner, E. M., Leitner, I., Eilers, M., Berger, J., Busslinger, M., and Beug, H. (1992). Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion. *Cell* 71, 1103-1116.

Ridley, A. J., Comoglio, P. M., and Hall, A. (1995). Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1110-1122.

Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-10.

Rodrigues, G. A., and Park, M. (1994). Autophosphorylation modulates the kinase activity and oncogenic potential of the Met receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 9, 2019-27.

Rodrigues, G. A., and Park, M. (1993). Dimerization mediated through a leucine zipper activates the oncogenic potential of the met receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6711-22.

Rodrigues, G. A., Park, M., and Schlessinger, J. (1997). Activation of the JNK pathway is essential for transformation by the Met oncogene. *Embo J* 16, 2634-45.

Rodriguez-Viciana, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., Waterfield, M. D., and Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370, 527-32.

Rong, S., Bodescot, M., Blair, D., Dunn, J., Nakamura, T., Mizuno, K., Park, M., Chan, A., Aaronson, S., and Vande Woude, G. F. (1992). Tumorigenicity of the met proto-oncogene and the gene for hepatocyte growth factor. *Mol Cell Biol* 12, 5152-8.

Rong, S., Jeffers, M., Resau, J. H., Tsarfaty, I., Oskarsson, M., and Vande Woude, G. F. (1993). Met expression and sarcoma tumorigenicity. *Cancer Res* 53, 5355-60.

Ronsin, C., Muscatelli, F., Mattei, M. G., and Breathnach, R. (1993). A novel putative receptor protein tyrosine kinase of the met family. *Oncogene* 8, 1195-202.

Rosen, E. M., Lathera, J., Joseph, A., Jin, L., Fuchs, A., Way, D., Witte, M., Weinand, M., and Goldberg, I. D. (1996). Scatter factor expression and regulation in human glial tumors. *Int J Cancer* 67, 248-55.

Royal, I., and Park, M. (1995). Hepatocyte growth factor-induced scatter of MDCK cells requires PI3-K. *J. Biol. Chem.* 270, 277780-277787.

Rozakis, A. M., Fernley, R., Wade, J., Pawson, T., and Bowtell, D. (1993). The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1 [see comments]. *Nature* 363, 83-5.

Rubin, J. S., Bottaro, D. P., and Aaronson, S. A. (1993). Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-met proto-oncogene product. *Biochim Biophys Acta* 1155, 357-71.

Ruco, L. P., Ranalli, T., Marzullo, A., Bianco, P., Prat, M., Comoglio, P. M., and Baroni, C. D. (1996). Expression of Met protein in thyroid tumours. *J Pathol* 180, 266-70.

Salcini, A. E., McGlade, J., Pelicci, G., Nicoletti, I., Pawson, T., and Pelicci, P. G. (1994). Formation of Shc-Grb2 complexes is necessary to induce neoplastic transformation by overexpression of Shc proteins. *Oncogene* 9, 2827-36.

Santos, O. F. Barros, E. J. Yang, X. M. Matsumoto, K. Nakamura, T. Park, M. Nigam, S. K. (1994). Involvement of hepatocyte growth factor in kidney development. *Dev Biol* 163, 525-9

Savagner, P., Yamada, K. M., and Thiery, J. P. (1997). The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 137, 1403-19.

Schaper, F., Siewert, E., Gomez, L. M., Gatsios, P., Sachs, M., Birchmeier, W., Heinrich, P. C., and Castell, J. (1997). Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) signals via the STAT3/APRF transcription factor in human hepatoma cells and hepatocytes. *FEBS Lett* 405, 99-103.

Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., and Birchmeier, C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702.

Schnarr, M., Granger-Schnarr, M., Hurstel, S., and Pouyet, J. (1988). The carboxy-terminal domain of the LexA repressor oligomerises essentially as the entire protein. *FEBS Lett* 234, 56-60.

Schneikert, J., Lutz, Y., and wasylyk, B. (1992). Two independent activation domains in c-ets1 and c-ets2 located in non conserved sequences of ets gene family. *Oncogene* 7, 249-256.

Slupsky, C. M., Gentile, L. N., Donaldson, L. W., Mackereth, C. D., Seidel, J. J., Graves, B. J., and McIntosh, L. P. (1998). Structure of the Ets-1 pointed domain and mitogen-activated protein kinase phosphorylation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12129-34.

Sonnenberg, E., Meyer, D., Weidner, K. M., and Birchmeier, C. (1993). Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol* 123, 223-35.

Stacey, K. J., Fowles, L. F., Colman, M. S., Ostrowski, M. C., and Hume, D. A. (1995). Regulation of urokinase-type plasminogen activator gene transcription by macrophage colony-stimulating factor. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3430-3441.

Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M., and Vogt, P. K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260, 170-3.

Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M., and Gray, J. (1987). Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial mobility. *Nature* 327, 239-242.

Sturgill, T. W., Ray, L. B., Erikson, E., and Maller, J. L. (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* 334, 715-8.

Tabata, M. J., Kim, K., Liu, J. G., Yamashita, K., Matsumura, T., Kato, J., Iwamoto, M., Wakisaka, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kumegawa, M., and Kurisu, K. (1996). Hepatocyte growth factor is involved in the morphogenesis of tooth germ in murine molars. *Development* 122, 1243-51.

Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J. A., and Reed, J. C. (1995). Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 80, 279-84.

Taniguchi, T., Kitamura, M., Arai, K., Iwasaki, Y., Yamamoto, Y., Igari, A., and Toi, M. (1997). Increase in the circulating level of hepatocyte growth factor in gastric cancer patients. *Br J Cancer* 75, 673-7.

Tanimura, S., Chatani, Y., Hoshino, R., Sato, M., Watanabe, S., Kataoka, T., Nakamura, T., and Kohno, M. (1998). Activation of the 41/43 kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway is required for hepatocyte growth factor-induced cell scattering. *Oncogene* 17, 57-65.

Thomas, S. M., and Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 513-609.

Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 8, 205-15.

Tuck, A. B., Park, M., Sterns, E. E., Boag, A., and Elliott, B. E. (1996). Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 148, 225-232.

Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shlota, K., Kuno, J., Noda, T., and Kitamura, N. (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373, 702-705.

Van, A. L., Barr, M., Marcus, S., Polverino, A., and Wigler, M. (1993). Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6213-7.

Vandenbunder, B., Pardanaud, L., Jaffredo, T., Mirabel, M. A., and Stéhelin, D. (1989). Complementary patterns of expression of c-ets 1, c-myb and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo. *Development* 107, 265-274.

Vandenbunder, B., Queva, C., Desbiens, X., Wernert, N., and Stéhelin, D. (1994). Expression of the transcription factor c-Ets1 correlates with the occurrence of invasive processes during normal and pathological development. *Invasion Metastasis* 14, 198-209.

Vanhaesebroeck, B., Leervers, S. J., Panayotou, G., and Waterfield, M. D. (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22, 267-72.

Villa-Moruzzi, E., Lapi, S., Prat, M., Gaudino, G., and Comoglio, P. M. (1993). A protein tyrosine phosphatase activity associated with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *J Biol Chem* 268, 18176-80.

Villa-Moruzzi, E., Puntoni, F., Bardelli, A., Vigna, E., De Rosa, S., and Comoglio, P. M. (1998). Protein tyrosine phosphatase PTP-S binds to the juxtamembrane region of the hepatocyte growth factor receptor Met. *Biochem J* 336, 235-9.

Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M., and Cooper, J. A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74, 205-14.

Wang, J. K., Xu, H., Li, H. C., and Goldfarb, M. (1996). Broadly expressed SNT-like proteins link FGF receptor stimulation to activators of Ras. *Oncogene* 13, 721-9.

Wang, L. C., Kuo, F., Fujiwara, Y., Gilliland, D. G., Golub, T. R., and Orkin, S. H. (1997). Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *Embo J* 16, 4374-83.

Wang, M. H., Ronsin, C., Gesnel, M. C., Coupey, L., Skeel, A., Leonard, E. J., and Breathnach, R. (1994). Identification of the ron gene product as the receptor for the human macrophage stimulating protein. *Science* 266, 117-9.

Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G., and Cooper, J. A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J* 16, 1909-20.

Wasylyk, B., Hagman, J., and Gutierrez-Hartmann, A. (1998). Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 23, 213-6.

Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D., and Stéhelin, D. (1990). The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* 346, 191-193.

Wasylyk, C., Gutman, A., Nicholson, R., and Wasylyk, B. (1991). The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *Embo J* 10, 1127-34.

Wasylyk, C., Kerckaert, J. P., and Wasylyk, B. (1992). A novel modulator domain of Ets transcription factors. *Genes Dev* 6, 965-74.

Wasylyk, C., Maira, S.-M., Sobieszczuk, P., and Wasylyk, B. (1994). Reversion of Ras transformed cells by Ets transdominant mutants. *Oncogene* 9, 3665-3673.

Weidner, K. M., Arakaki, N., Hartmann, G., Vandekerckhove, J., Weingart, S., Rieder, H., Fonatsch, C., Tsubouchi, H., Hishida, T., Daikuhara, Y., and Birchmeier, W. (1991). Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7001-7005.

Weidner, K. M., Dicesare, S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J., and Birchmeier, W. (1996). Interaction between *gab1* and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature* 384, 173-176.

Weidner, K. M., Sachs, M., and Birchmeier, W. (1993). The Met receptor tyrosine kinase transduces mobility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 121, 145-154.

Weidner, K. M., Sachs, M., and Birchmeier, W. (1995). Mutation of juxtamembrane tyrosine residue 1001 suppresses loss-of-function mutations of the met receptor in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *92*, 2597-2601.

Werner, M. H., Clore, G. M., Fisher, C. L., Fisher, R. J., Trinh, L., Shiloach, J., and Gronenborn, A. M. (1995). The solution structure of the human ETS1-DNA complex reveals a novel mode of binding and true side chain intercalation. *Cell* *83*, 761-771.

Wernert, N., Gilles, F., Fafeur, V., Bouali, F., Raes, M.-B., Pyke, C., Dupressoir, T., Seitz, G., Vandenbunder, B., and Stéhelin, D. (1994). Stromal expression of c-ets1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res.* *54*, 5683-5688.

Wernert, N., Raes, M.-B., Lassalle, P., Dehouck, M.-P., Gosselin, B., Vandenbunder, B., and Stéhelin, D. (1992). C-ets-1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularisation and other forms of angiogenesis in man. *Am. J. Pathol.* *140*, 119-127.

Woolf, A. S., Kolatsi, Joannou M., Hardman, P., Andermarcher, E., Moorby, C., Fine, L. G., Jat, P. S., Noble, M. D., Gherardi, E. (1995). Roles of hepatocyte growth factor/scatter factor and the met receptor in the early development of the metanephros. *J Cell Biol* *128*, 171-84.

Xu, H., Lee, K. W., and Goldfarb, M. (1998). Novel recognition motif on fibroblast growth factor receptor mediates direct association and activation of SNT adapter proteins. *J Biol Chem* *273*, 17987-90.

Yang, B. S., Hauser, C. A., Henkel, G., Colman, M. S., Vanbeveren, C., Stacey, K. J., Hume, D. A., Maki, R. A., and Ostrowski, M. C. (1996). Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 538-547.

Yang, Y., Spitzer, E., Meyer, D., Sachs, M., Niemann, C., Hartmann, G., Weidner, K. M., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (1995). Sequential requirement of hepatocyte growth factor and neuregulin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland. *J Cell Biol* *131*, 215-26.

Zhang, X. F., Settleman, J., Kyriakis, J. M., Takeuchi, S. E., Elledge, S. J., Marshall, M. S., Bruder, J. T., Rapp, U. R., and Avruch, J. (1993). Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* *364*, 308-13.

Zhen, Z., Giordano, S., Longati, P., Medico, E., Campiglio, M., and Comoglio, P. M. (1994). Structural and functional domains critical for constitutive activation of the HGF-receptor (Met). *Oncogene* *9*, 1691-7.

Zhu, H., Naujokas, M. A., Fixman, E. D., Torossian, K., and Park, M. (1994). Tyrosine 1356 in the carboxyl-terminal tail of the HGF/SF receptor is essential for the transduction of signals for cell motility and morphogenesis. *J Biol Chem* *269*, 29943-8.

Zioncheck, T. F., Richardson, L., Liu, J., Chang, L., King, K. L., Bennett, G. L., Fugedi, P., Chamow, S. M., Schwall, R. H., and Stack, R. J. (1995). Sulfated oligosaccharides promote

hepatocyte growth factor association and govern its mitogenic activity. *J Biol Chem* 270, 16871-8.

